

Charakterisierung Antigen-spezifischer T-Zellen nach
Induktion in TCR-humanisierten Mäusen

MANON WEIS

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Charakterisierung Antigen-spezifischer T-Zellen nach
Induktion in TCR-humanisierten Mäusen

von Manon Weis
aus Homburg

München 2015

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Thomas Göbel

Angefertigt am Institut für Molekulare Immunologie
Helmholtz-Zentrum München
Mentor: Prof. Dr. Dolores Schendel

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Thomas Göbel

Korreferenten: Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Univ.-Prof. Dr. Lutz S. Göhring

Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

Tag der Promotion: 31. Janur 2015

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I	EINLEITUNG.....	1
	1. Immuntherapien für Krebspatienten.....	1
	1.1 Anti-Tumor Vakzinen.....	2
	1.2 Adotiver T-Zell-Transfer	6
	2. Prostatakrebs als Indikation für Immuntherapien.....	10
	3. Ziel-Antigene für Immuntherapien zur Behandlung von Prostatakrebs-Patienten.....	12
	3.1 PRAME-Antigen.....	14
	3.2 PSMA-Antigen.....	14
	4. Generierung Antigen-spezifischer T-Zellen <i>in-vitro</i> und <i>in-vivo</i>..	15
	4.1 ABabDII-Mausmodell.....	17
	5. Zielsetzung der Arbeit.....	18
II	MATERIAL UND METHODEN.....	19
	1. Material.....	19
	1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial.....	19
	1.2 Enzyme, Zytokine und sonstige Reagenzien.....	21
	1.3 Kommerzielle Analysesysteme.....	24
	1.4 Kulturmedien.....	25
	1.5 Puffer und Lösungen.....	26
	1.6 Zelllinien und Bakterien.....	26
	1.7 Plasmide, Primer und Oligonukleotide.....	27
	1.8 Peptide.....	30
	1.9 Antikörper und Tetramer.....	31
	1.10 Personen.....	31
	1.1 Software.....	32
	2. Methoden.....	33
	2.1 Zellbiologische Methoden.....	33
	2.1.1 Bestimmung der Zellzahl.....	33
	2.1.2 Einfrieren von Zellen.....	33
	2.1.3 Auftauen von Zellen.....	34
	2.1.4 Kultivierung adhärenter Zellen.....	34

2.1.5	Kultivierung von Suspensionszellen.....	34
2.1.6	Kultivierung etablierter T-Zell-Klone und Stimulation...	34
2.1.7	Kultivierung von PBMC.....	35
2.1.8	Isolierung von PBMC aus Vollblut.....	35
2.1.9	Generierung maturer Dendritischer Zellen (3d mDC)....	36
2.1.10	Transfektion verschiedener Zelllinien.....	37
2.1.11	Transfektion von HEK-293T-Zellen.....	38
2.1.12	Transduktion von PBL.....	39
2.1.13	Transduktion von T-Zell-Klonen.....	40
2.1.14	Peptidbeladung von T2-Zellen.....	40
2.1.15	Coinkubation von T-Zellen mit APC.....	40
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	41
2.2.1	Bakterienstämme.....	41
2.2.2	Agarose-Gelelektrophorese von DNA.....	42
2.2.3	DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....	42
2.2.4	Sequenzierungen.....	42
2.2.5	DNA-Restriktionsverdau.....	42
2.2.6	Hybridisierung von Oligonukleotiden.....	43
2.2.7	Ligation von DNA-Fragmenten.....	43
2.2.8	Generierung der Vektorkonstrukte zur Re-Expression spezifischer T-Zell-Rezeptoren.....	44
2.2.9	Transformation elektrokompenter Bakterien mit Plasmid-DNA.....	45
2.2.10	Transformation chemisch kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA.....	46
2.2.11	Selektion und Expansion transformierter Bakterien.....	46
2.2.12	Extraktion von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien.....	47
2.2.13	Linearisierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA.....	47
2.2.14	Herstellung von <i>ivt</i> -mRNA.....	48
2.2.15	Agarose-Gelelektrophorese von <i>ivt</i> -mRNA-Produkten...	48
2.2.16	Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen von Nucleinsäuren.....	49
2.3	Analytische Methoden.....	49
2.3.1	IFN- γ ELISA.....	49

2.3.2	Chrom-Freisetzungs-Test.....	50
2.4	Durchflusszytometrie.....	51
2.4.1	Färbung extrazellulärer Proteine.....	51
2.4.2	Färbung intrazellulärer Proteine.....	52
2.4.3	Tetramerfärbung.....	53
2.4.4	Färbung des T-Zell-Aktivierungsmarkers CD137.....	53
2.4.5	IFN- γ Capture Assay.....	53
2.4.6	Sortierung spezifischer Zellpopulationen.....	54
2.5	Nukleinsäureanalysen in verschiedenen Zellen.....	55
2.5.1	Isolierung zellulärer Gesamt-RNA.....	55
2.5.2	Reverse Transkription von mRNA zu cDNA.....	56
2.5.3	Antigen-Expressionsanalysen mittels qRT-PCR.....	56
2.5.4	RACE-PCR zur Analyse von TCR α - und TCR β - Sequenzen.....	57
2.5.5	Sequenzanalyse der RACE-PCR-Produkte.....	62
2.6	<i>In-vivo</i> Versuche.....	64
2.6.1	ABabDII Mausmodell.....	64
2.6.2	Immunisierung von ABabDII-Mäusen.....	66
2.6.3	Organentnahme und Inkulturnahme der isolierten Zellen.....	67
III	ERGEBNISSE.....	68
1.	Vergleich verschiedener Methoden zur Isolierung spezifischer T-Zellen: MART-1-immunisierte ABabDII-Mäuse als Modellsystem.....	68
1.1	Möglichkeiten zur Isolierung Peptid-spezifischer T-Zellen aus ABabDII-Mäusen.....	68
1.1.1	<i>In-vivo</i> Induktion und Isolierung MART-1- spezifischer T-Zellen.....	70
1.1.2	Etablierung der Methoden zur TCR-Sequenzanalyse.....	72
2.	<i>In-vivo</i> Induktion Antigen-spezifischer T-Zellen in ABabDII- Mäusen durch Immunisierung mit Prostatakrebs-assoziierten Peptiden.....	76
2.1	Wahl geeigneter Prostatakrebs-assoziiierter Peptide zur <i>in-vivo</i> Induktion Antigen-spezifischer T-Zellen.....	76

2.1.1	Klinische Daten, Peptid-MHC-Affinität und Spezies-Unterschiede in der Peptidsequenz als Entscheidungsgrundlage.....	76
2.2	Immunisierung der ABabDII-Mäuse und Analyse der murinen PBMC auf Peptid-spezifische T-Zellen.....	83
2.3	Isolierung Peptid-spezifischer T-Zellen aus ABabDII-Mäusen.....	87
2.4	Isolierung von TCR-Sequenzen aus den angereicherten, Peptid-spezifischen T-Zellen.....	90
2.4.1	Identifizierung zusammengehöriger TCR α/β -Ketten.....	99
2.5	Charakterisierung des PRAME-spezifischen TCR-3825.....	100
2.5.1	Re-Expression von TCR-3825.....	100
2.5.2	Bestätigung der Funktionalität von TCR-3825.....	101
2.5.3	Peptid-Spezifität und Affinität von TCR-3825.....	103
2.5.4	Erkennung des PRAME-Antigens durch TCR-3825....	104
2.5.5	Spezifische Lyse PRAME-exprimierender Zielzellen durch TCR-3825.....	107
2.5.6	Spezifitäts-Testung des TCR-3825 mit Hilfe einer HLA-A2-Selbstpeptid-Bibliothek.....	109
2.5.7	Kreuzreaktivität des TCR-3825 mit einem dem SLL-Epitop ähnlichen Selbstpeptid.....	112
2.5.8	Retrovirale Transduktion von T-Zellen und PBMC mit TCR-3825.....	116
2.6	Erste Funktionsanalyse des PSMA-spezifischen TCR- 3822.....	120
IV	DISKUSSION.....	122
1.1	Induktion Antigen-spezifischer T-Zellen im ABabDII-Mausmodell.....	123
1.2	Isolierung Antigen-spezifischer T-Zellen.....	125
1.3	Identifizierung der T-Zell-Rezeptor-Sequenzen.....	126
1.4	Charakterisierung des PRAME-spezifischen TCR-3825.....	130
1.4.1	Spezifität des TCR-3825 und mögliche Risiken für den adoptiven T-Zell-Transfer.....	132

1.4.2	Zukünftige Analysen bzgl. Spezifität und potentieller Toxizität des TCR-3825.....	134
1.5	Weiterer Ausblick und Resümee.....	136
V	ZUSAMMENFASSUNG.....	138
VI	SUMMARY.....	140
VII	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	142
VIII	LITERATURVERZEICHNIS.....	145
IV	ANHANG.....	164

I EINLEITUNG

1. Immuntherapien für Krebspatienten

Viele Krebserkrankungen können mit Hilfe der klassischen Behandlungsmethoden, wie z.B. chirurgische Exzision, Chemotherapie und Bestrahlung, nicht effektiv behandelt oder gar geheilt werden. In den letzten zwei Jahrzehnten haben sich Forschungsgruppen weltweit mit der Frage beschäftigt, inwiefern man das menschliche Immunsystem für die Bekämpfung von Tumoren rekrutieren kann, und welche therapeutischen Möglichkeiten sich daraus für Krebspatienten ergeben (Couzin-Frankel, 2013). Dabei gibt es verschiedene Möglichkeiten, eine Anti-Tumor-Immunantwort zu induzieren, so z.B. Vakzinen mit gentechnisch modifizierten Tumorzellen, Impfstoffe mit Dendritischen Zellen (DC-Vakzinen), den adoptiven T-Zell-Transfer, Antikörper-Therapien und die Blockade sog. „Checkpoints“ des Immunsystems (Raval et al., 2014). Durch die Entdeckung und funktionelle Charakterisierung von Oberflächenmolekülen, wie CD28 und CTLA-4 (Azuma et al., 1992; Harding, 1992; Krummel und Allison, 1995; Jenkins et al., 1994) oder PD-1 (Agata et al., 1996; Freeman et al., 2000), welche durch stimulatorische oder inhibitorische Signale die Aktivierung von T-Zellen beeinflussen, ergaben sich neue Möglichkeiten, von außen regulierend in das Immunsystem einzugreifen. So gibt es mittlerweile recht vielversprechende Studien, in denen durch die Blockade des Moleküls CTLA-4 mit einem monoklonalen, CTLA-4-spezifischen Antikörper eine Anti-Tumor-Immunantwort induziert werden kann (Chambers et al., 2001; Raval et al., 2014). Seit 2011 ist der Anti-CTLA-4-Antikörper „Ipilimumab“ zur Behandlung von Patienten mit metastasierten Melanomen zugelassen (Hodi et al., 2010; Lipson und Drake, 2011). Die monoklonalen, PD-1-spezifischen Antikörper „Lambrolizumab“ und „Nivolumab“, welche die Blockade des inhibitorischen Moleküls PD-1 vermitteln, zeigen in den bisher durchgeführten Studien vielversprechende Ergebnisse in Patienten mit kleinzelligem und nicht-kleinzelligem Lungenkrebs, Prostatakrebs, Nierenzellkarzinomen und hämatologischen Krebserkrankungen (Topalian et al., 2012; Hamid et al., 2013; Weintraub, 2013; Karimkhani et al.,

2014). Auch eine kombinatorische Blockade von CTLA-4 und PD-1 scheint äußerst vielversprechend. So zeigten in einer 2013 durchgeführten Studie, 53% der damit behandelten Melanom-Patienten eine Reduktion der Tumorlast um 80% oder mehr (Wolchock et al., 2013; Weintraub 2013).

Monoklonale Anti-Tumor Antikörper, welche für Tumor-assoziierte Antigene wie CD20 oder HER-2 spezifisch sind, gehören mittlerweile zu den gängigen Behandlungsmethoden für viele Krebspatienten (Raval et al., 2014). Durch die Bindung eines Antikörpers an eine spezifische Oberflächenstruktur auf Tumorzellen, werden z.B. Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) rekrutiert, welche dann die Zellen mit den gebundenen Antikörpern spezifisch eliminieren. Dieser Prozess wird als „Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität“ (ADCC) bezeichnet (Clynes et al., 2000; Murphy et al., 2009).

Als weitere Möglichkeiten, spezifischen Einfluss auf das humane Immunsystem zu nehmen, bzw. zielgerichtete Immunantworten zu induzieren, wurden bereits Anti-Tumor-Vakzinen und der adoptive T-Zell-Transfer erwähnt. Aufgrund ihrer Relevanz für die vorliegende Arbeit, sollen diese im Folgenden genauer ausgeführt werden.

1.1 Anti-Tumor-Vakzinen

Die effiziente Induktion einer CD8 T-Zell-Antwort, welche allgemein als die effektivste Anti-Tumor-Antwort betrachtet wird, erfordert die Prozessierung von Antigenen und die Präsentation von Peptidfragmenten auf MHC-Klasse-I-Molekülen, welche dann durch den TCR-CD3-Komplex auf T-Zellen erkannt werden können. Auf MHC-Klasse-I-Molekülen werden endogene Peptide präsentiert, welche von im Zytosol degradierten Zellen stammen und dann im Endoplasmatischen Retikulum (ER) auf die MHC-Moleküle geladen werden. Dieser Peptid-MHC-Komplex (pMHC) wird dann zur Plasmamembran transportiert und dort an der Oberfläche präsentiert (Joffre et al., 2012). Die Präsentation dieser endogenen Peptide ermöglicht dem Immunsystem die Erkennung derjenigen Zellen, die Fremd-Peptide oder veränderte Selbst-Peptide

präsentieren, und stellt somit einen wichtigen Abwehrmechanismus gegen Viren und Krebszellen dar (Delamarre et al., 2011; Fehres et al., 2014). Peptid-MHC-Komplexe können direkt von naiven CD8-T-Zellen erkannt werden. Um jedoch zu effektiven T-Effektorzellen mit zytotoxischem Potential zu differenzieren, benötigen die T-Zellen potente, costimulatorische Signale von Antigen-präsentierenden Zellen (APC). Des Weiteren sind APC in der Lage, exogene, von Mikroorganismen oder Tumoren stammende, Peptide zu internalisieren, prozessieren und auf MHC-Klasse-I-Molekülen dem Immunsystem zu präsentieren. Dieser Prozess wird als Antigen-Kreuzpräsentation bezeichnet (Heath et al., 2004).

Professionelle Antigen-präsentierende Zellen sind DC, Makrophagen und B-Zellen. Dabei handelt es sich bei den DC um die primären und potentesten Antigen-präsentierenden Zellen (Den Haan et al., 2000; Kurts et al., 2001). Für eine effektive T-Zell-Stimulation sind drei Signale erforderlich, welche von der APC an die T-Zelle vermittelt werden müssen. Zum einen sind das die adäquate Peptid-MHC-Präsentation und die durch CD80 und CD86 vermittelte Costimulation. Als drittes Signal werden Zytokine ausgeschüttet, welche nicht nur in der Lage sind, die Aktivierung der T-Zellen zu unterstützen, sondern auch die zukünftige phänotypische Entwicklung der T-Zellen entscheidend beeinflussen (Janeway et al., 2009; Linette und Carreno, 2013). So induziert die Sekretion von IFN- γ und IL-12 die Differenzierung von CD4-T-Zellen zu T_H1-Zellen und von CD8-T-Zellen zu T_C1-T-Zellen, während die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 die Differenzierung in T_H2- und T_C2-T-Zellen induzieren (Schmidt et al., 1999; Ansel et al., 2003; Agarwal et al., 2009; Janeway et al., 2009; Carreno et al., 2013).

Durch die Aufnahme von Pathogenen werden bis dahin ruhende, unreife DC aktiviert und durchlaufen einen Maturierungsprozess. Aktivierte, mature DC (mDC) exprimieren dann eine hohe Konzentration an Pathogen-Peptid-MHC-Komplexen und costimulatorischen Molekülen wie CD80 und CD86 (Signal 1 und 2). Auch Zell-Adhäsionsmoleküle, welche für die Migration der DC wichtig sind, werden vermehrt exprimiert. Des Weiteren werden wichtige immun-modulatorische Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-23 und Interferone sezerniert (Signal 3). All diese Eigenschaften ermöglichen es den Dendritischen Zellen, Antigene zu präsentieren und damit T-Zellen zu stimulieren, und gleichzeitig Einfluss auf die Entwicklung der naiven T-Zellen zu nehmen (Banchereau und Steinman, 1998; Janeway et al., 2009; Raval et al.,

2014). Daher wurde in den letzten Jahren viel Aufwand betrieben, sich diese Eigenschaften der DC in Form von Anti-Tumor-Vakzinen zur Induktion von Anti-Tumor-Immunantworten zunutze zu machen. Da DC nur eine sehr kleine Fraktion der Immunzellen des menschlichen Körpers ausmachen (weniger als 1% der mononukleären Zellen), ist zur Herstellung einer DC-basierten Vakzine die Isolierung von DC-Vorläuferzellen (Monozyten) aus dem Blut eines Spenders nötig. Diese Vorläuferzellen werden dann *in-vitro* kultiviert, evtl. maturiert und mit Antigen beladen, um dann in den Patienten zurück infundiert zu werden (Engell-Noerregaard, 2009). Es gibt unterschiedliche Ansätze zur *in-vitro*-Kultur der DC, üblicherweise werden die Monozyten mit Hilfe der Zytokine IL-4 und GM-CSF (Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor) innerhalb von 7 Tagen zu immatures Dendritischen Zellen (iDC) ausdifferenziert (Sallusto, 1994; Jonuleit et al., 1997). Mittlerweile gibt es auch Protokolle, nach denen qualitativ vergleichbare DC in kürzerer Zeit hergestellt werden können. So haben Dauer et al. (2003) ein Protokoll entwickelt, nachdem DC innerhalb von 2 Tagen ausdifferenziert werden können. Die Arbeitsgruppe um Prof. Schendel, in der diese Doktorarbeit angefertigt wurde, hat in den letzten Jahren ein 3-Tage-Maturierungsprotokoll entwickelt (Spranger et al., 2010; Bürdek et al., 2010; Frankenberger und Schendel, 2012). Auch wurde viel darüber diskutiert, in welchem Maturierungs- bzw. Aktivierungs-Stadium die DC am besten zur Induktion einer T-Zell-Antwort geeignet sind. Dabei hat sich vermehrt gezeigt, dass vor allem in Hinblick auf eine effiziente T-Zell-Stimulation mature DC den immatures DC deutlich überlegen sind (De Vries et al., 2003), und dass immature DC sogar eher eine T-Zell-Toleranz gegenüber präsentierten Antigenen induzieren können (Mosca et al., 2000; Engell-Noerregaard, 2009). Des Weiteren gibt es verschiedene Möglichkeiten, die Dendritischen Zellen mit Antigenen zu beladen, welche sie dann dem Immunsystem des Patienten präsentieren sollen. Die DC können mit Proteinen oder Tumor-Lysaten inkubiert werden, welche sie dann aufnehmen, prozessieren und als Peptid-Fragmente präsentieren. Alternativ können sie extern mit Peptiden beladen werden oder mit Antigen-kodierender cDNA oder mRNA transfiziert werden. Javorovic et al. (2005) und Wilde et al. (2009), aus der Arbeitsgruppe Schendel, konnten zeigen, dass mit Antigen-kodierender mRNA transfizierte, mature 3-Tages-DC äußerst potente T-Zell-Stimulatoren sind. Diese DC präsentieren adäquate Konzentrationen von Peptid-MHC-Komplexen auf ihrer Oberfläche, sie exprimieren alle nötigen

Costimulatorischen Moleküle und die typischen Oberflächen-Marker immaturer DC (z.B. CD14) sind stark reduziert. Durch die Inkorporation von TLR7- und TLR-8-Agonisten (TLR: Toll-Like-Rezeptor) in den Maturierungscocktail der 3-Tages-DC wird zusätzlich die Produktion und Sekretion von IL-12 induziert, was als Signal 3 die Entwicklung einer T_H1- und T_C1-T-Zell-Antwort induziert, und zu der angestrebten, effektiveren Anti-Tumor-Immunantwort führt (Snijders et al., 1998; Mosca et al., 2000; Carreno et al., 2013;) Diese DC verfügen somit über alle Eigenschaften, welche Antigen-präsentierende Zellen einer Anti-Tumor Vakzine aufweisen sollten. Die Arbeitsgruppe Schendel am Helmholtz-Zentrum in München (zukünftig Trianta Immunotherapies GmbH), in welcher diese 3-Tages-DC entwickelt wurden, arbeitet zusammen mit der Arbeitsgruppe von Prof. Kvalheim an der Universität in Oslo an Studien zur klinischen Evaluierung dieser Form der DC-Vakzine-Formulierung. Dabei werden die Antigen-beladenen 3-Tages-DC eingesetzt, um Anti-Tumor-Immunantworten in Glioblastom-, Prostatakrebs- und AML- (akute myeloische Leukämie) Patienten zu induzieren. Es gibt bereits klinische Studien mit DC-Vakzinen für Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen (Timmermann et al., 2002), Myelomen (Richter et al., 2013), AML (Van Tendeloo et al., 2010) und Melanomen (Carreno et al., 2013) und verschiedenen anderen Krebserkrankungen.

Im Jahr 2010 wurde dann in den Vereinigten Staaten „Sipuleucel-T“ als erste DC-basierte, autologe Immuntherapie von der FDA (Food and Drug Administration der Vereinigten Staaten) für Patienten mit Kastrations-resistentem Prostatakrebs zugelassen (Vertrieben unter dem Namen „Provenge“ von der Firma Dendreon). Das Überleben behandelter Patienten konnte um durchschnittlich etwa 4 Monate verlängert werden (Small et al., 2006; Higano et al., 2009; Kantoff et al., 2010; Anassi et al., 2011). Trotz einer Vielzahl an Studien und einzelner Erfolge, welche durchaus Hoffnungen bezüglich der Wirksamkeit von Anti-Tumor-Vakzinen wecken, konnte das volle immunstimulatorische Potential der DC noch nicht entfaltet werden. Bei den in den bisherigen Studien verwendeten APC handelte es sich meist entweder um immature DC oder um mature DC, die jedoch nicht über die Fähigkeit verfügten, IL-12 (Signal 3) zu sezernieren (Carreno et al., 2013). Daher gibt es eine begründete Hoffnung, dass die von Schendel et al. entwickelten, maturen und IL-12 sezernierenden 3-Tages-DC eine neue, potentere Form der Anti-Tumor-Vakzinierung ermöglichen.

1.2 Adoptiver T-Zell-Transfer

Unter adoptivem T-Zell-Transfer (ACT) versteht man die Isolierung, *ex-vivo*-Expansion und gegebenenfalls genetische Manipulation und anschließende Rück-Infusion von patienteneigenen, Tumor-spezifischen T-Zellen zur Bekämpfung von Krebserkrankungen. Bei den isolierten T-Zellen handelt es sich entweder um bereits Tumor-reaktive Zellen aus dem Blut oder direkt aus dem Tumor isolierte T-Zellen (TIL: Tumor infiltrierende Lymphozyten), welche dann *ex-vivo* expandiert werden, so dass anschließend die vielfache Menge der zuvor isolierten T-Zellen nach Rück-Infusion eine gezielte und verstärkte Tumorbekämpfung ermöglicht. Alternativ dazu können naive T-Zellen aus den Patienten isoliert werden, welche dann *in-vitro* aktiviert oder durch genetische Manipulation mit verbesserten, Tumor-reaktiven Eigenschaften ausgestattet werden. Diese Manipulation besteht darin, dass die T-Zellen transgen mit neuen, Antigen-spezifischen Rezeptoren ausgestattet werden, welche dann eine Erkennung entsprechender Antigen-exprimierender Tumorzellen ermöglicht. Bei den Rezeptoren kann es sich entweder um klassische α/β -T-Zell-Rezeptoren, oder aber um chimere Antigen-Rezeptoren (CAR) handeln, welche aus B- und T-Zell-Rezeptor-Fragmenten bestehende Hybrid-Rezeptoren sind.

CAR besitzen eine Antigen-Bindungs-Domäne (CDR: complementary determining region), die entweder aus einer einzelnen Kette der variablen Region (scFv: single-chain variable Fragment) oder dem kompletten Antigen-Bindungs Fragment (Fab-Fragment) eines monoklonalen Antikörpers besteht. Über eine extrazelluläre- und eine Transmembran-Domäne sind diese B-Zell-Rezeptor-Fragmente mit der intrazellulären Signal-Domäne eines T-Zell-Rezeptors verbunden (Curran et al., 2012; Davila et al., 2012). Die CAR der zweiten und dritten Generation verfügen über die intrazellulären Signaldomänen costimulatorischer Moleküle wie CD28, 4-1BB oder ICOS (Wieczorek und Uharek, 2013; Jensen und Riddell, 2014). Während CAR, genauso wie Antikörper, die dreidimensionale Struktur von Oberflächenmolekülen erkennen, binden klassische TCR an von MHC-Molekülen präsentierte Peptid-Fragmente intrazellulärer Proteine. Während TCR also durch ihre HLA-Restriktion jeweils nur in einer bestimmten Patienten-Population eingesetzt werden können, und ihre Effektivität aufgrund der oft verminderten oder nicht vorhandenen MHC-

Expression von Tumorzellen noch weiter eingeschränkt ist, sind CAR unabhängig vom HLA-Typ des Patienten. Des Weiteren können die B-Zell-Rezeptor-Ketten eines CAR nicht mit den T-Zell-Rezeptor-Ketten eines in der T-Zelle vorhandenen endogenen TCR paaren. Die Vermeidung neuer TCR mit völlig unbekannter Spezifität durch eine solche „Fehlpaarung“, wie sie mit klassischen TCR stattfinden kann, ist ein nicht unerheblicher Sicherheitsaspekt. Jedoch entsprechen α/β -TCR der „natürlichen“ Variante der Anti-Tumor-Bekämpfung, transduzierte TCR sind kaum immunogen (im Gegensatz zu CAR, deren CDR häufig von murinen Antikörpern stammt) und nur sie können zu einer gezielten Eliminierung von Tumorzellen mit mutierten intrazellulären Proteinen eingesetzt werden. Es hängt also primär davon ab, welche Antigen-Strukturen man wählt, um eine Aussage darüber treffen zu können, welche Rezeptor-Variante zur Tumorbekämpfung besser geeignet ist, ein CAR oder ein klassischer α/β -TCR (June et al., 2012, Dotti et al., 2014). Die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Verwendung im Rahmen des adoptiven T-Zell-Transfers sind sowohl für TCR als auch CAR die gleichen. Der Rezeptor muss stabil und in hohem Maße auf der Oberfläche der transduzierten T-Zellen exprimiert werden, die transferierten T-Zellen müssen nach Re-Infusion in den Patienten *in-vivo* expandieren und der Rezeptor darf keine, durch die unspezifische Erkennung körpereigener Selbstpeptide bedingte, Toxizität vermitteln. Des Weiteren muss der Rezeptor über eine adäquate Affinität für sein Antigen verfügen und in der Lage sein, Antigen-exprimierende Tumorzellen effektiv zu lysieren und somit zu eliminieren (Wieczorek und Uharek, 2013).

Es wurden bereits einige wenige klinische Studien mit adoptiv transferierten, sowohl CAR- als auch TCR-transgenen T-Zellen, bei Patienten mit unterschiedlichen Krebserkrankungen durchgeführt. Antigen-spezifische CAR wurden unter anderem an Nierenzellkarzinom- (Lamers et al., 2006), Ovarialkrebs- (Kershaw et al., 2006), Neuroblastom- (Park et al., 2007) und Brustkrebs-Patienten (Morgan et al., 2010) getestet.

Äußerst vielversprechend waren die von Kochenderfer et al. (2010 und 2012) durchgeführten Studien mit einem Anti-CD19-spezifischen CAR bei Patienten mit B-Zell-Lymphomen. Das Oberflächenmolekül CD19 wird ausschließlich auf B-Zellen exprimiert und stellt damit ein hervorragend geeignetes Zielantigen für adoptiv transferierte, Antigen-spezifische T-Zellen dar. In diesen Studien konnte

die gezielte Eliminierung CD19⁺ B-Zellen und die Expansion der CAR-transgenen T-Zellen nachgewiesen werden. Toxische Nebenwirkungen resultierten primär aus einer überschießenden Zytokinfreisetzung (sog. „Zytokin-Sturm“), vor allem durch die transferierten T-Zellen. Kalos et al. (2011) und Porter et al. (2011) konnten bei drei CLL-Patienten (CLL: chronische lymphatische Leukämie) einen deutlichen Rückgang der Tumorlast nachweisen, nachdem diese mit Anti-CD19-spezifischen CAR behandelt wurden. Bei allen Patienten wurde eine langanhaltende, Anti-CD19-spezifische Immunantwort beobachtet. Des Weiteren konnten sowohl Erwachsene (Brentjens et al., 2013) als auch Kinder (Grupp et al., 2013) mit ALL (ALL: akute lymphatische Leukämie) erfolgreich mit Anti-CD19-spezifischen CAR behandelt werden. Aufgrund der oft sehr schlechten Prognose und hohen Sterblichkeit für Patienten mit hämatologischen Krebserkrankungen und den wenigen vorhandenen Therapiemöglichkeiten, stellt diese neue Form der Immuntherapie eine vielversprechende Behandlungsmöglichkeit dar. Trotz der oft nicht unerheblichen Nebenwirkungen, resultierend aus der therapiebedingten B-Zell-Aplasie und überschießender Zytokinfreisetzungen, scheint der ACT mit CAR bei diesen Patienten durchaus gerechtfertigt (Hinrichs und Rosenberg, 2014).

Auch die Verwendung klassischer T-Zell-Rezeptoren im Rahmen des adoptiven T-Zell-Transfers wurde mittlerweile in einer Vielzahl an klinischen Studien für die unterschiedlichsten Indikationen evaluiert.

Die ersten Studien mit TCR-transgenen, adoptiv transferierten T-Zellen wurden mit einem MART-1-spezifischen TCR (MART-1: Melanoma antigen recognized by T cells 1) an Patienten mit einem metastasierenden Melanom von Morgan et al. (2006) durchgeführt. Bei zwei von 15 behandelten Patienten konnte ein Rückgang der Tumorlast beobachtet werden, ohne jegliche Form von Nebenwirkungen. In einer anschließenden Studie von Johnson et al. (2009), bei der ein höher affiner, MART-1-spezifischer TCR verwendet wurde, wurde bei sechs von 20 Melanom-Patienten eine Anti-Tumor-Reaktion nachgewiesen. Bei drei Patienten war diese Anti-Tumor-Reaktion langanhaltend und beinhaltete auch die Regression von Metastasen in der Lunge und im Gehirn. Jedoch stellten sich durch die Behandlung mit diesem höher affinen TCR auch Nebenwirkungen ein, bedingt durch die Expression des MART-1-Antigens in Melanozyten der Haut, des Ohres und des Auges. Nichtsdestotrotz konnten mit diesen Studien nicht nur deutliche,

durch die TCR-transgenen T-Zellen vermittelte Anti-Tumor-Effekte nachgewiesen werden. Es konnte auch gezeigt werden, dass die transferierten T-Zellen die verschiedensten Körpergewebe invadieren und dort Antigen-exprimierende Zellen eliminieren können (Hinrichs und Rosenberg, 2014). Diese Eigenschaft der T-Zellen birgt zum einen ein enormes therapeutisches Potential, zum anderen erwächst daraus die ständige Gefahr unerwünschter, autoreaktiver und somit toxischer Nebenwirkungen.

Zur Behandlung von Patienten mit kolorektalem Adenokarzinom wurden CEA-spezifische (CEA: carcinoembryonic antigen) TCR generiert und für den adoptiven T-Zell-Transfer verwendet (Parkhurst et al., 2009 und 2011), und auch dabei konnte eine Regression der Tumormetastasen erreicht werden. Eine weitere vielversprechende Studie zur Behandlung von Patienten mit Synovialzell-Sarkomen und malignen Melanomen wurde von Robbins et al. (2011) mit einem NY-ESO-1-spezifischen TCR (NY-ESO: New York Esophageal Squamous Cell Carcinoma Antigen 1) durchgeführt. Bei Verwendung dieses NY-ESO-spezifischen TCR wurden keinerlei Nebenwirkungen festgestellt, was die sehr gute Eignung des NY-ESO-Proteins als Zielantigen beweist. Ein weiteres Cancer-Testis-Antigen (CTA), welches als gutes Zielantigen für den adoptiven T-Zell-Transfer betrachtet wird ist MAGE-A3 (MAGEA3: Melanoma Antigen Family 3). Die Verwendung eines hoch affinen, MAGE-A3-spezifischen TCR bei Myelom- und Melanom-Patienten hat in Studien von Morgan et al. (2013) zum einen zu einem drastischen Rückgang der Tumorlast bei fünf von neun Patienten geführt, bei einem Patienten fand sogar eine vollständige Regression statt. Allerdings traten bei vier Patienten schwerwiegende neurologische Nebenwirkungen auf, welche auf eine Kreuzreaktivität des transgenen MAGE-A3-Rezeptors mit MAGE-A12- und wahrscheinlich auch MAGE-A9-exprimierenden Neuronen im Gehirn zurückzuführen war. In einer weiteren Studie, bei der ein anderer, jedoch ebenfalls MAGE-A3-spezifischer TCR verwendet wurde, traten aufgrund einer Kreuzreaktivität des verwendeten TCR mit dem im Myokard exprimierten Muskelprotein Titin schwere kardiologische Nebenwirkungen auf, die bei zwei behandelten Patienten zum Tod führten (Cameron et al., 2013; Linette et al., 2013).

Diese und auch andere Studien haben gezeigt, dass der adoptive T-Zell-Transfer unter Verwendung klassischer TCR aufgrund oftmals nicht absehbarer Toxizitäten eine hochriskante Therapieoption darstellt. Die nicht bekannte Expression des

Zielantigens und somit die Erkennung von Nicht-Tumorgeweben durch den transgenen TCR kann in Form einer „On-Target“-Toxizität zu schweren Nebenwirkungen führen. Des Weiteren kann es zur sogenannten „Off-Target“-Toxizität kommen, wenn der transgene TCR von seinem Epitop abweichende, unbekannte Zielstrukturen in Nicht-Tumorgeweben erkennt (Wucherpfennig et al., 2007). Auch eine Fehlpaarung der TCR-Ketten von transgenem und endogenem TCR kann zu einer solchen „Off-Target“-Toxizität führen (Schumacher, 2002; Schmitt et al., 2009; Van Loenen et al., 2010; Aggen et al., 2012). Nichtsdestotrotz stellt diese Form der Immuntherapie für viele Patienten mit bislang unheilbaren Krebserkrankungen die möglicherweise einzige und auch beste Option der Behandlung dar, welche in den kommenden Jahren bezüglich ihrer Risiken natürlich noch stark optimiert werden muss.

2. Prostatakrebs als Indikation für Immuntherapien

Bei Prostatakrebs handelt es sich um die häufigste Krebserkrankung, und die zweithäufigste, mit einer Krebserkrankung assoziierte Todesursache bei Männern in Europa und Nordamerika (Berrino et al., 2007; Siegel et al., 2013). Wird die Erkrankung in einem frühen Stadium erkannt, bevor es zu einer Metastasierung in andere Organe kommen konnte, so haben die Patienten aufgrund einer Vielzahl effektiver Behandlungsmöglichkeiten im Allgemeinen eine gute Prognose. In fortgeschrittenem Stadium, wenn bereits eine Metastasierung, zumeist in die regionären Lymphknoten und die Knochen, stattgefunden hat, sind die Therapieoptionen deutlich reduziert. Meistens wird mit Hilfe einer sog. „Hormon-Entzugs-Therapie“ versucht, den Prostatazellen das als Wachstumshormon fungierende Testosteron zu entziehen. Dies geschieht entweder mittels chirurgischer oder chemischer Kastration (mit Testosteron-Antagonisten oder Testosteron-Rezeptor-Blockern) und hat einen immensen Einfluss auf die Lebensqualität der behandelten Patienten. Zusätzlich werden oft auch verschiedene kombinatorische Therapien mit Chemotherapeutika durchgeführt. Mit diesen Behandlungen lässt sich ein bereits metastasiertes Prostatakarzinom jedoch nur etwa 13-22 Monate therapieren. Nach einer gewissen Zeit fangen die Tumorzellen trotz des Hormon-Entzugs unweigerlich wieder an zu wachsen und

weiter zu metastasieren, man spricht dann von Kastrations-resistentem oder Hormon-refraktärem Prostatakrebs (HPRC: hormone refractory prostate cancer). Mit Beginn der Hormon-Resistenz verschlechtert sich die Prognose der Patienten akut, die durchschnittliche Überlebensdauer für Patienten bei denen ein bereits metastasiertes Prostatakarzinom diagnostiziert wurde, liegt bei 28 – 36 Monaten (Sternberg et al., 2008). Derzeit gibt es keine wirksamen Therapieoptionen für diese Patienten.

Das Versagen klassischer Behandlungsmethoden bei HPRC-Patienten und der dringende Bedarf an neuen, effektiven Therapieoptionen für diese Patienten, hat in den letzten Jahren die Tür für immuntherapeutische Behandlungsansätze geöffnet.

Es wurde bereits eine Vielzahl klinischer Studien an Prostatakrebs-patienten mit unterschiedlichsten immunologischen Ansätzen durchgeführt (Small et al., 2000; Burch et al., 2000; Small et al., 2007; Brill et al., 2007; Brill et al., 2009; Kwon et al., 2014). Dabei konnte zwar oftmals eine entweder humorale oder zelluläre Immunantwort induziert werden, klinisch relevante Anti-Tumor-Effekte blieben jedoch aus (Jacobs et al., 2014).

Mit „Sipuleucel-T“ (Small et al., 2006; Higano et al., 2009; Kantoff et al., 2010) wurde zur Behandlung von HPRC-Patienten 2010 die erste, DC-basierte, autologe Immuntherapie überhaupt zugelassen, und der Durchbruch der Immuntherapien zur Behandlung von Krebspatienten schien geschafft. Mittlerweile werden jedoch immer häufiger Bedenken zu den für die Zulassung durchgeführten Studien geäußert (Huber et al., 2012; Jacobs et al., 2014), und ob die behandelten Patienten tatsächlich, in Form einer verlängerten durchschnittlichen Überlebensdauer, davon profitieren. Auch der Wirkmechanismus dieser Vakzine-Formulierung ist noch nicht ausreichend verstanden. Dennoch weist die Zulassung dieses mittlerweile umstrittenen Medikamentes auf den dringenden Bedarf an neuen Behandlungsmöglichkeiten hin, was auch neue immuntherapeutische Ansätze mit einbezieht.

Aufgrund dessen wurde Prostatakrebs zum einen als geeignete Indikation für erste Studien zur klinischen Evaluierung der von Schendel et al. entwickelten 3-Tages-DC als Anti-Tumor-Vakzine ausgewählt. Diese klinischen DC-Vakzine-Studien sollen in Zusammenarbeit mit Prof. Gunnar Kvalheim am Universitätsklinikum in Oslo durchgeführt werden.

Des Weiteren stellt HPRC eine geeignete Indikation für den adoptiven T-Zell-

Transfer dar.

Für beide Ansätze ist die Wahl der Antigene, gegen welche mittels Antigen-beladener DC im Patienten eine spezifische T-Zell-Antwort induziert werden soll, bzw. welche von den Antigen-spezifischen, adoptiv transferierten T-Zellen als Ziel-Antigene erkannt werden sollen, von entscheidender Bedeutung.

3. Ziel-Antigene für Immuntherapien zur Behandlung von Prostatakrebs-Patienten

Als Ziel-Antigene für Immuntherapien sind nur solche Antigene geeignet, welche eine hohe Expression in Tumorgeweben zeigen, jedoch nicht bzw. möglichst gering in Normalgeweben exprimiert sind (Kunert et al., 2013). Nach Lucas und Coulie (2008) trifft dies zum einen auf Differenzierungs-Antigene zu (z.B. MART-1 oder Tyrosinase), welche in unterschiedlichen Stadien der Zell-Aktivierung oder Gewebe-Entwicklung exprimiert werden. Des Weiteren trifft dies auf überexprimierte Antigene zu, welche zwar nicht selektiv in Tumorgeweben exprimiert werden, im Vergleich zu Normalgeweben dort jedoch stark überexprimiert sind (z.B. HER-2/neu). Bei Cancer-Testis-Antigenen (CTA) handelt es sich um Proteine, welche von Tumoren, aber auch vom Testes-Gewebe exprimiert werden (NY-ESO oder PRAME), welches jedoch aufgrund der fehlenden MHC-Expression kein Zielgewebe für T-Zellen darstellt (Jassim et al., 1989; Smith und Cerundolo, 2008). Dann gibt es noch die sog. Neo-Antigene, welche durch Mutationen ganz spezifisch in Tumor-Zellen entstehen und exprimiert werden (z.B. mutiertes CDK4).

Antigene, welche sich aufgrund ihres Expressions-Musters als Ziel-Antigene für immuntherapeutische Ansätze zur Behandlung von Prostatakrebs-Patienten eignen, wurden von verschiedenen Forschungsgruppen identifiziert und beschrieben (Weinschenk et al., 2002; Novellino et al., 2005; Li et al., 2010).

Die interessantesten CaP-assoziierten Ziel-Antigene sind unter anderem PRAME, PSMA, und PSCA. Tabelle I-1 zeigt eine Übersicht über sowohl spezifische, als auch CaP-assoziierte Antigene und deren Expression in Tumor- und Normalgeweben.

Tabelle I-1 Prostatakrebs-assoziierte Antigene

Gen	Expression in Tumorgeweben	Expression in Normalgeweben
EPCAM	Adenokarzinome	Epithelgewebe
Her2/neu	Melanom, Ovarial-, Darm-, Brust-, Pankreas- und Prostatakarzinom	Lunge, Herz
NY-ESO	Melanom, Myelom, Lungenkarzinom, Blasenkrebs, Brust- und Prostatakarzinom	Ovarien
PAP	Prostatakarzinom	Prostata, Blase, Nieren, Pankreas, Lunge u.a.
PCTA	Prostatakarzinom , Kehlkopfkrebs	ubiquitär
PRAME	Melanom, Lungenkarzinom Prostatakarzinom , AML	Testes (evtl. Nieren, Haut, Gehirn)
PSA	Prostatakarzinom , Melanom	Prostata und Melanozyten
PSCA	Prostata-, und Pankreaskarzinom	Prostata, Blase, Plazenta u.a.
PSGR	Prostatakarzinom	Prostata
PSMA	Prostatakarzinom, Neovaskulatur versch. solider Tumoren	Prostata, Blase, Nieren, Testes, Gehirn, u.a.
PTH-rP	Prostatakarzinom und andere epitheliale Tumoren	ubiquitär
STEAP	Prostatakarzinom, Tumoren der Blase, der Ovarien und des Darms	Prostata
Survivin	Melanom, Prostata-, Pankreas-, Lungen- und Blasenkarzinome u.a.	Testes, Thymus, Plazenta

Referenzen: Hubert et al., 1999; Correale et al., 2001; Weinschenk et al., 2002; Novellino et al., 2005; Cludts et al., 2009; Li et al., 2010; Weber et al., 2011; Abate-Daga et al., 2014 ; www.uniprot.org und www.omim.org

EPCAM: Epithelial Cellular Adhesion Molecule
 NY-ESO: New York Esophageal Squamous Cell Carcinoma
 PAP: Prostatic Acid Phosphatase
 PCTA: Prostate Carcinoma Tumor Antigen
 PRAME: Preferentially Expressed Antigen in Melanoma
 PSCA: Prostate Stem Cell Antigen
 PSMA: Prostate Specific Membrane Antigen
 PSGR: Prostate-Specific G Protein-Coupled Receptor
 PTH-rP: Parathyroid Hormone-related Protein
 STEAP: Six-Transmembrane Epithelial Antigen of Prostate

Aufgrund ihrer Bedeutung für die hier angefertigte Arbeit, werden im Folgenden die Antigene PRAME und PSMA kurz genauer ausgeführt.

3.1 PRAME-Antigen

Das PRAME-Protein besteht aus 509 Aminosäuren und wird zu den Cancer-Testis-Antigenen gezählt, welche generell nur im Testes- und Tumor-Gewebe exprimiert werden. PRAME ist ein Repressor des Retinolsäure-Signalweges, indem es mit Retinolsäure-Rezeptoren interagiert, welche als Regulatoren der hämatopoetischen Differenzierung und Apoptose fungieren (Epping et al., 2005; Wadelin et al., 2010). Dadurch spielt PRAME womöglich eine Rolle in der Differenzierung und Proliferation hämatopoetischer Gewebe. PRAME wird stark exprimiert in Tumoren hämatopoetischer Herkunft, wurde jedoch auch in anderen soliden Tumoren der Lunge und der Prostata nachgewiesen (Weber et al., 2011). Da die Expression dieses Proteins in Normalgeweben nur sehr gering ist, stellt es ein gutes Zielantigen für Immuntherapien dar (Amir et al., 2011)

3.2 PSMA-Antigen

PSMA ist ein Transmembranprotein mit einer kürzeren intrazellulären (18 Aminosäuren) und einer langen extrazellulären Domäne (706 Aminosäuren), welche über eine Transmembran-Domäne (24 Aminosäuren) miteinander verbunden sind. Es handelt sich dabei um ein Enzym, welches als glykolysierte Metallo-Peptidase mittels zweier Zink-Ionen seine Substrate hydrolysiert. Die genauere Funktion von PSMA ist nicht bekannt.

PSMA wird primär in der Prostata und in entarteten Prostatazellen exprimiert, und zwar in allen Entwicklungsstadien. In Androgen-insensitiven und metastasierten Tumorzellen wird die Expression dieses membrangebundenen Oberflächen-Proteins hoch-reguliert. Außer in Prostata Tumoren wird PSMA auch in der Neo-Vaskulatur vieler anderer, solider Tumoren exprimiert, nicht jedoch in der normalen Vaskulatur (Li et al., 2010).

Somit scheint PSMA ein äußerst gut geeignetes Ziel-Antigen für Immuntherapien, vor allem zur Behandlung von Prostatakrebs-Patienten darzustellen. PSMA wurde von Cheever et al. (2009) in einer für das amerikanische National Cancer Institute erarbeiteten Liste zu den am besten geeigneten Zielantigenen für Anti-Tumor-Immuntherapien gezählt.

4. Generierung Antigen-spezifischer T-Zellen *in-vitro* und *in-vivo*

Um im Rahmen des adoptiven T-Zell-Transfers die T-Zellen von Patienten mit Antigen-spezifischen TCR ausstatten zu können, müssen diese T-Zell-Rezeptoren zuerst einmal generiert und isoliert, identifiziert und anschließend charakterisiert werden.

Auch zur Evaluierung der 3-Tages-DC-Vakzinen sind T-Zellen, welche das Antigen spezifisch erkennen, das von den Dendritischen Zellen präsentiert wird, von großer Bedeutung. Wenn das Antigen, mit dem die DC mittels Antigen-kodierender *ivt*-RNA beladen wurden, adäquat präsentiert wird, und wenn die DC gleichzeitig alle nötigen costimulatorischen Signale und Zytokine bereitstellen, dann werden T-Zellen effektiv aktiviert. Wenn diese Antigen-präsentierenden DC *in-vitro* Antigen-spezifische T-Zellen aktivieren können (was man mittels einfacher Cokultur-Versuche überprüfen kann), dann ist auch davon auszugehen, dass die DC im Patienten naive T-Zellen, und somit eine Anti-Tumor-Immunantwort induzieren können. Antigen-spezifische T-Zellen werden also als „*in-vitro*-Testsystem“ für diese DC-Vakzine benötigt.

Antigen-spezifische T-Zellen können entweder *in-vivo* oder *in-vitro* generiert und isoliert werden.

Zum einen können Antigen-spezifische T-Zellen aus Tumor-Patienten isoliert werden, welche eine zelluläre Immunantwort gegen Tumor-Antigene entwickelt haben. Der MART-1-spezifische TCR, der in den von Morgan et al. (2006) durchgeführten Studien verwendet wurde, wurde aus den TIL eines Melanom-Patienten mit nahezu vollständiger Tumor-Regression, nach adoptivem Transfer dieser MART-1-spezifischen TIL, isoliert. Robbins et al. (2011) verwendeten in ihren Studien einen ebenfalls aus einem Melanom-Patienten isolierten, NY-ESO-spezifischen TCR (Jäger et al., 1998). Aus Patienten isolierte TCR, welche für humane Selbstpeptide spezifisch sind, sind normalerweise nur gering bis intermediär affin für ihr erkanntes Antigen, da hochaffine, Selbstpeptid-spezifische TCR während der T-Zell-Entwicklung im Thymus negativ selektiert werden (Starr et al., 2003; Aleksic et al., 2012). Die aus Patienten isolierten TCR sind also für eine effektive Tumor-Bekämpfung meist zu wenig affin, können

jedoch auf molekularer Ebene so verändert werden, dass sich ihre Affinität deutlich verbessert (Robbins et al., 2008). Durch die Veränderung der natürlichen TCR-Struktur kann die Affinität eines TCR zwar verbessert werden, jedoch kann dies auch ungeahnte Auswirkungen auf seine Spezifität haben. Da dieser veränderte TCR nie den Prozess der natürlichen Selektion durchlaufen hat, besteht bei künstlich veränderten TCR immer ein erhöhtes Risiko nicht absehbarer Kreuzreaktivitäten.

Des Weiteren können Antigen-spezifische TCR mit Hilfe HLA-transgener Mäuse *in-vivo* generiert werden (Parkhurst et al., 2009 und 2011; Morgan et al., 2013). Dadurch, dass in der Maus hoch affine TCR gegen humane Selbstpeptide nicht negativ selektiert werden, kann man durch Immunisierung der Mäuse mit humanen Antigenen hochaffine TCR generieren. Werden die murinen TCR für den adoptiven T-Zell-Transfer verwendet, so können zwar Anti-Tumor-Immunantworten induziert werden, die murinen TCR-Sequenzen werden vom humanen Immunsystem jedoch häufig als fremd erkannt. Durch diese Immunogenität werden die mit murinen TCR transduzierten T-Zellen schnell vom Immunsystem eliminiert, wodurch die Anti-Tumor-Wirkung dieser T-Zellen nur sehr kurz ist und es zudem zu toxischen Nebenwirkungen kommen kann.

Alternativ können Antigen-spezifische T-Zellen mit Hilfe von *in-vitro*-Primings durch Cokultivierung humaner PBMC mit Antigen-präsentierenden Zellen generiert werden. Werden solche *in-vitro* Primings mit den APC und PBMC ein und desselben Spenders durchgeführt (autologer Ansatz), können nur niedrig bis intermediär affine T-Zellen induziert werden. Durch Cokultivierung von PBMC und APC im allogenen Ansatz (also APC und PBMC von zwei Spendern mit unterschiedlichem HLA-Typ) können T-Zellen mit deutlich höher affinen TCR induziert werden (Sadovnikova et al., 1998; Savage et al., 2004). Auch bei Verwendung von APC und PBMC des gleichen Spenders, können durch Einbringung neuer MHC-Moleküle in die APC (mittels allo-MHC-kodierender *ivt*-mRNA) höher affine TCR generiert werden (Wilde et al., 2009). Dabei müssen jedoch äußerst sorgfältige Untersuchungen bezüglich der Restriktion der induzierten TCR durchgeführt werden, um sicherzustellen, dass der TCR nicht gegen das allogene MHC-Element alleine, sondern gegen den Peptid-MHC-Komplex generiert wurde.

4.1 ABabDII-Mausmodell

Um nun die Vorteile dieser beiden Möglichkeiten zur Generierung Antigen-spezifischer T-Zell-Rezeptoren zu vereinen, wurde von Li et al (2010 und 2013) ein Mausmodell generiert, welches transgen für den kompletten humanen TCR α - und TCR β -Genlocus und humanes HLA-A2 ist. Zusätzlich sind diese Tiere defizient für die entsprechenden murinen TCR α/β -Genloci und murines H2-D. Die murinen T-Zellen exprimieren also humane T-Zell-Rezeptoren, denen Peptide auf humanen MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden. Da im murinen System T-Zell-Rezeptoren, welche hochaffin für humane Antigene sind, bekanntlich nicht negativ selektiert werden, können durch Immunisierung dieser sogenannten ABabDII-Mäuse hochaffine, humane T-Zell-Rezeptoren gegen humane Selbstpeptide generiert werden.

Die aus diesen Mäusen isolierten T-Zell-Rezeptoren sind also „natürliche“, hochaffine TCR, ohne dass ihre Sequenz künstlich modifiziert werden muss. Des Weiteren sind die aus den Mäusen isolierten TCR humane TCR, es besteht also nicht das Risiko, dass die TCR im Rahmen des adoptiven T-Zell-Transfers im humanen System immunogen wirken. Zusätzlich bietet die *in-vivo*-Generierung dieser Rezeptoren den Vorteil, dass die bei den *in-vitro*-Primings anfallende, äußerst Zeit- und Kosten-intensive Zellkultur entfällt. Dieses in der Arbeitsgruppe von Prof. Blankenstein in Berlin entwickelte Mausmodell stellt somit ein äußerst wertvolles Werkzeug zur Generierung von T-Zell-Rezeptoren dar, die allen Kriterien entsprechen, die ein Rezeptor für den adoptiven T-Zell-Transfer erfüllen soll.

5. Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Generierung Antigen-spezifischer T-Zell-Rezeptoren, welche spezifisch für Prostatakrebs-assoziierte Antigene sein sollten. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Blankenstein in Berlin wurde das ABabDII-Mausmodell zur *in-vivo*-Generierung hochaffiner, humaner TCR verwendet. Die spezifischen TCR sollten aus den Mäusen isoliert und die TCR-Sequenzen bestimmt werden. Anschließend sollten die isolierten T-Zell-

Rezeptoren mittels Re-Expressionsanalysen genauer charakterisiert werden, um zum einen ihre Eignung als neue TCR-Kandidaten für den adoptiven T-Zell-Transfer zur Behandlung von Patienten mit Hormon-Refraktären Prostatakarzinomen zu evaluieren. Zum anderen sollten isolierte TCR dahingehend untersucht werden, ob sie sich als Testsystem zur Evaluierung einer DC-Vakzine für Prostatakrebspatienten eignen.

II MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Tabelle II-1 Geräte

Produkt	Firma, Firmensitz
Bestrahlungsanlage ^{137}Cs , HWM-D-2000	Gammacell, Ottawa
Brutschrank, CO ₂ -Auto-Zero	Heraeus, München
Eismaschine	Scottsman, Mailand
Elektroporator Gene Pulser Xcell™	Bio-Rad, München
ELISA-Reader Sunrise	Tecan, Crailsheim
Durchflusszytometer Calibur	BD, Heidelberg
Durchflusszytometer LSR II	BD, Heidelberg
Gefrierschrank	Liebherr, Ochsenhausen
Gelapparatur DNA Sub Cell	Bio-Rad, München
Gelapparatur Geltray	Renner, Dannstadt
Gelprint 2000i	Biophotonics, Ann Arbor (USA)
Heizblock Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
InGenius System IG-E	Synoptics, Cambridge (UK)
Intelli Mixer RM-2	LTF Labortechnik, Wasserburg
Kühlschrank	Siemens, München
Kühlzentrifuge 2K15	Sigma, Osterode am Harz
Kühlzentrifuge Eppendorf Centrifuge 54172	Eppendorf, Hamburg
Laborwaagen B6, P120, PC440	Mettler, Gießen
Lichtmikroskop, Auflicht	Leica, Wetzlar
Lichtmikroskop, Durchlicht	Zeiss, Göttingen
Magnetrührer IKA RCT	Bachofen, Reutlingen
Mehrkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg
Mikrowellengerät FM 3510	Moulinex, Frankreich
Milli-Q® Reinstwasserherstellungssystem	Millipore, Schwalbach
Nalgene „Mr. Frosty“ Freezing Container	Thermo-Scientific, Massachusetts
NanoDrop ND-1000	Peqlab, Erlangen
Neubauer-Zählkammer	neoLab, München
PCR-Master Cycler	Eppendorf, Hamburg

PCR-Thermocycler T-1	Biometra®, Göttingen
pH-Meter pH391	WTW, Weilheim
Pipetten Eppendorf	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetus Akku	Hirschmann, Ebersberg
Plattenzentrifuge Labofuge 6000	Heraeus, München
Schüttler MTS4	IKA, Staufen
Schüttler TR125	Infors, Bottmingen (Schweiz)
Schüttler Vortex Genie 2	Bachofen, Reutlingen
Sterilbank	BDK, Sonnbühl-Genkingen
Stickstofftank Chronos Biosafe	Messer Griesheim, Krefeld
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus, München
Tischzentrifuge Hettich Mikroliter	Bachofen, Reutlingen
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
TopCount NXT™ Microplate Scintillation and Luminescence Counter	PerkinElmer, Akron Ohio
UV Transluminator, 302nm/365nm	Synoptics, Cambridge (UK)
UV Transluminator, 366nm	Bachofen, Reutlingen
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zellsortierer, FACS Aria III	BD, Heidelberg
Zentrifuge Eppendorf Minispin	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge IEC 6000B	ICE, Bedfordshire (UK)
Zentrifuge Megafuge 2.0	Heraeus, München

Tabelle II-2 Verbrauchsmaterial

Produkt	Firma, Firmensitz
1,5 ml -Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Einmalpipetten, 5-/10-/25-ml	Greiner, München
Einmalspritzen, 1-/10-/50-ml	BD, Heidelberg
Eismaschine	Scottsman, Mailand (Italien)
Elektroporationsküvetten, 01-/0,4-cm	Bio-Rad, München
FACS™ Röhrchen	Peske OHG, Aindling
Falcon-Röhrchen, 15-/50-ml	BD, Heidelberg
Filterpapier	Materiallager, Neuherberg
Kryo-Röhrchen, 1,8-ml	Nunc, Wiesbaden
Kulturplatten, 24-/48-Loch, Flachboden	BD, Heidelberg
Kulturplatten, 6-/48-/96-Loch, Flachboden	TPP, Trasadingen (Schweiz)
Kulturplatten, 96-Loch, Rundboden	TPP, Trasadingen (Schweiz)
LUMA-Platten (TM-96)	PerkinElmer, Akron Ohio

Nitrilhandschuhe	Semperit, Wien (Österreich)
Nunc-Immuno™ MicroWell™ 96 Well	Nunc, Wiesbaden
Nunclon™ Δ Surface Zellkulturflaschen	Thermo-Scientific, Massachusetts
NuPAGE® Novex Bis-Tris Gels	Invitrogen, Karlsruhe
Pasteurpipetten	Peske OHG, München
PE Folie, selbstklebend	Macherey-Nagel, Düren
Petrischalen (Falcon)	BD, Heidelberg
Pipettenspitzen Eppendorf/Greiner	Materiallager, Neuherberg
Pipettenspitzen, gestopft	Starlab, Ahrensberg
Zellfilter	BD, Heidelberg
Zellkulturflaschen (25 cm ² und 175 cm ²)	BD, Heidelberg
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	Greiner, München
Zellkulturflaschen (Nunclon™ 25cm ² und 80cm ²)	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturplatten (35 ml, Nunclon™ 150 x 20)	Nunc, Wiesbaden

1.2 Enzyme, Zytokine und sonstige Reagenzien

Tabelle II-3 Restriktionsenzyme

Produkt	Firma, Firmensitz
AgeI	New England Biolabs, Frankfurt
BglII	New England Biolabs, Frankfurt
BstEII	New England Biolabs, Frankfurt
DraIII-HF	New England Biolabs, Frankfurt
EcoRI-HF	New England Biolabs, Frankfurt
EcoRV	New England Biolabs, Frankfurt
FspI	New England Biolabs, Frankfurt
KpnI	New England Biolabs, Frankfurt
SpeI	New England Biolabs, Frankfurt

Tabelle II-4 Zytokine und TLR-Liganden

Produkt	Firma, Firmensitz
GM-CSF, human	Berlex, Seattle
Interferon- γ (IFN- γ), human	Boehringer Ingelheim, Ingelheim
Interleukin-1 β (IL-1 β), human	R&D Systems, Wiesbaden
Interleukin-2 (IL-2), human	Chiron Behring, Marburg
Interleukin-2 (IL-2), murin	ImmunoTools, Friesoythe
Interleukin-4 (IL-4), human	R&D Systems, Wiesbaden
Interleukin-6 (IL-6), human	R&D Systems, Wiesbaden
Interleukin-7 (IL-7), human	Rockland, Pennsylvania
Poly(I:C) (Hiltonol)	InvivoGen, San Diego
Prostaglandin E2 (PGE2)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
R848	InvivoGen, San Diego
Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), human	R&D Systems, Wiesbaden

Tabelle II-5 Sonstige Reagenzien

Produkt	Firma, Firmensitz
1 kb-plus DNA-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
100bp DNA-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
1-Brom-3-Chloropropan	Merck, Darmstadt
Agar, SELECT Agar®	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose, Ultra Pure	Invitrogen, Karlsruhe
AIM V Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Invitrogen, Karlsruhe
Bi-destilliertes Wasser	neo-Lab, München
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chrom 51 (CrRa5/8 5mCi in 1ml)	Hartmann Analytic, Hannover
Count Off Liquid Concentrate	PerkinElmer, Akron Ohio
DEPC (Diethyl-Pyrocbonat)	Sigma, Deisenhofen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
DNA-Autragspuffer (6x)	Invitrogen, Karlsruhe
DNA-Oligonukleotide	Sigma-Aldrich, St- Louis
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Deisenhofen
EDTA [0,5 M]	Applied Biosystems, Darmstadt
Einfriermedium, Ibidi Freezing Medium	Ibidi, Planegg/Martinsried

Ethanol (absolut)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid, 10mg/ml	Merck, Darmstadt
FACS™ Flow und Rinse	BD, Heidelberg
FCS (Fötales Kälberserum)	Invitrogen, Karlsruhe
Ficoll®	Biochrom, Berlin
GeneRuler™ 1kb plus DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 100 bp plus DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Geneticin 50mg/ml	Life Technologies, Frankfurt
Gentamycin 10mg/ml	Life Technologies, Frankfurt
Glukose	Braun, Melsungen
Glycerin, 87%	Merck, Darmstadt
HCl (Salzsäure)	Merck, Darmstadt
Heparin-Natrium	Braun, Melsungen
HEPES	Invitrogen, Karlsruhe
HS (Humanserum)	IMI, München
Actalbin (Human-Serum-Albumin-Lösung)	Octopharma, Langen
Isopropanol	Sigma, Deisenhofen
LB Broth Base (Miller's LB Broth Base)	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
MEM (1x), Non Essential Amino Acids (NEAA)	Invitrogen, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumazetat [3 M] (C ₂ H ₃ NaO ₂)	Applied Biosystems, Darmstadt
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma, Deisenhofen
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
Natronlauge (NaOH)	Merck, Darmstadt
OptEIA™ TMB Substrate	BD, Heidelberg
OptiMEM I Medium	Invitrogen, Karlsruhe
PBS	Life Technologies, Frankfurt
PBS (very low endotoxin, VLE)	Biochrome AG, Berlin
PEI, Polyethylenimin	Sigma-Aldrich, Steinheim
PFA, Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
PHA, Purified Phytohaemagglutinin	Remel, Dartford (UK)
PI, Propidiumjodid	ICN, Eschwege
Protaminsulfat	Merck, Darmstadt
Retronectin	Tatkara, Saint-Germain-en-Laye
RiboRuler™ High Range RNA Ladder	Thermo-Scientific, Massachusetts
RPMI 1640 ohne L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI (very low endotoxin, VLE)	Biochrome AG, Berlin

S.O.C.-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
T4-Ligase	New England BioLabs, Frankfurt
T4-Polymerase	New England BioLabs, Frankfurt
TAE (Tris Acetat EDTA) Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
Tetracyclin	Merck, Darmstadt
TRI-Reagent®	Molecular Research Center, Cincinnati
Tris, Hydroxymethyl-Aminomethan	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA (10x)	Promega, Mannheim
Tween 20	ICN, Eschwege

1.3 Kommerzielle Analysesysteme

Tabelle II-6 Kommerzielle Analysesysteme

Produkt	Firma, Firmensitz
Advantage 2 PCR Enzyme System	Clontech, Mountain View (USA)
BD® CompBeads Anti-Mouse Ig, κ Set	BD, Heidelberg
First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	Roche Diagnostics, Mannheim
Foxp3 Fixation/Permeabilisation Concentrate and Diluent	eBioscience, San Diego
JETstar Plasmid Purification Maxi Kit	Genomed, Löhne
mMESSAGE mMACHINE™ T7 Kit	Ambion, Corston (UK)
Mouse IFN-γ Secretion Assay, Cell Enrichment & Detection Kit	Miltenyi, Bergisch Gladbach
OptEIA™ Human IFN-γ ELISA Set	BD Biosciences
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick® Reaction Cleanup Kit	Qiagen GmbH, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit	Clontech Mountain View
Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit for Sequencing	Invitrogen, Karlsruhe

1.4 Kulturmedien

Tabelle II-7 Kulturmedien

Produkt	Zusammensetzung	Konzentration
HEK 293T-Zell-Medium	DMEM	
	FCS	10%
	L-Glutamin	2mM
	Natriumpyruvat	1mM
	Penicillin/Streptomycin	500µg/ml
DC-Medium	RPMI 1640	
	Humanserum	1,5%
LB-Medium	LB Broth Base (Miller's)	25g/l
LB-Agar-Medium	LB-Medium	
	Agar	15g/l
LCL-Medium	RPMI 1640	
	FCS	10%
	L-Glutamin	2mM
	Natriumpyruvat	1mM
	MEM Nichtessentielle Aminosäuren	1x
SOB-Medium	Trypton	20g/l
	Hefeextrakt	5g/l
	NaCL	0,5g/l
	MgCL ₂	10mM
	MgSO ₄	10mM
SOC-Medium	SOB-Medium	
	Glucose	2g/l
T-Zell-Medium	RPMI 1640	
	Humanserum	10%
	HEPES (1M)	10mM
	L-Glutamin	2mM
	Natriumpyruvat	1mM
	MEM Nichtessentielle Aminosäuren	1x
	IL-2	0-100U/ml
CM-Medium	RPMI 1640	
	FCS	10%
	L-Glutamin	2mM
	Natriumpyruvat	1mM
	MEM Nichtessentielle Aminosäuren	1x
	Gentamycin	8mg/ml

1.5 Puffer und Lösungen

Tabelle II-8 Puffer und Lösungen

Produkt	Zusammensetzung	Konzentration
1% Milchpulverlösung (ELISA)	PBS Milchpulver	1%
DEPC-Wasser	DEPC	0,1%
ELISA-Beschichtungspuffer	NaHCO ₃ 8,4g/l Na ₂ CO ₃	3,56g/l
ELISA-Waschpuffer	PBS Tween20	0,05%
FACS-Puffer	PBS FCS	1%
Waschpuffer für IFN- γ Capture Assay	PBS BSA EDTA	0,5% 2mM
ACK-Erythrozyten-Lyse-Puffer (10x)	Aqua dest. NH ₄ Cl KHCO ₃ EDTA	200ml 16,5g 2g 74mg

1.6 Zelllinien und Bakterien

Tabelle II-9 Zelllinien

Zellen	Charakteristika	Quelle
DU145	Prostatakrebs-Zelllinie HLA-A*02:01 negativ	Heike Pohla
HEK 293T	Embryonale Nierenzelllinie, Transformiert durch Teile des Humanen-Adenovirus-5-Genoms, exprimieren SV40 Large-T-Antigen	Invitrogen
K562	Chronische myeloische Leukämiezelllinie	
K562 A2	Chronische myeloische Leukämiezelllinie HLA-A*02:01-transduziert	
LAZ 388	Lymphoblastoide Zelllinie, EBV-transformiert	P. Schrier
LNCaP	Prostatakrebs-Zelllinie HLA-A*02:01 positiv	Heike Pohla

Mel 624.38	Melanomzelllinie HLA-A*02:01 positiv	M.C. Panelli
Mel A375	Melanomzelllinie HLA-A*02:01 positiv	ATCC
mLCL ME	Mini-EBV transformierte B-Zellen HLA-A*02:01 positiv	Christian Ellinger
mLCL MRE	Mini-EBV transformierte B-Zellen HLA-A*02:01 positiv	Christian Ellinger
PBL	Nach Plattenadherenz, von gesunden Spendern	Manon Weis
PBMC	von gesunden Spendern	Manon Weis
PC3	Prostatakrebs-Zelllinie HLA-A*02:01 negativ	Heike Pohla
SW M1-58	T-Zell-Klon, MART-1--spezifisch, HLA-A*02:01 restringiert, HLA-A*02:01 neg.	Susanne Wilde
SW M1-67	T-Zell-Klon, MART-1-spezifisch, HLA-A*02:01 restringiert, HLA-A*02:01 neg.	Susanne Wilde
T2	Hybrid einer T- sowie B-lymphoblastoiden Zelllinie, TAP-defizient, HLA-A*02:01 positiv	M.C. Panelli

Tabelle II-10 Bakterien

Bakterien	Charakteristika	Quelle
E.coli XL1 Blue MRF'	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44</i> <i>relA1 lac</i> [F'proAB lacIqZΔM15 Tn10 TetR] Tetracyclin-Resistenz	Stratagene
E.coli One Shot® Mach 1™-T1 ^R	F-φ80(<i>lacZ</i>)ΔM15 Δ <i>lacX74 hsdR</i> (r _K -m _K ⁺) Δ <i>recA1398 endA1 tonA</i>	

1.7 Plasmide, Primer und Oligonukleotide

Tabelle II-11 Plasmide

Plasmid	Eigenschaft/Verwendung	Resistenz	Quelle
pAV12-3-3822-A116	pGEM-Vektor, T7-Promotor polyA ₁₁₆ -Abschnitt, PSMA-spez. CDR3, α-Kette AV12-3	Ampicillin	M.Weis

pAV22-3825-A116-ARE	pGEM-Vektor, T7-Promotor polyA ₁₁₆ -Abschnitt, ARE-Sequ., PRAME-spez. CDR3, α -Kette AV22	Ampicillin	M.Weis
pBV27-3825-A116-ARE	pGEM-Vektor, T7-Promotor polyA ₁₁₆ -Abschnitt, ARE-Sequ. PRAME-spez. CDR3, β -Kette BV27	Ampicillin	M.Weis
pBV6-5-3822-A116	pGEM-Vektor, T7-Promotor polyA ₁₁₆ -Abschnitt, PSMA-spez. CDR3, β -Kette BV6-5	Ampicillin	M.Weis
pBV6-5-OT-1-A116	pGEM-Vektor, T7-Promotor polyA ₁₁₆ -Abschnitt, OT-1-spez. CDR3, β -Kette BV6-5	Ampicillin	S. Milošević
pRAV12-3-OT-1-A116	MP71-Vektor, polyA ₁₁₆ -Abschnitt OT-1-spez. CDR3, α -Kette AV12-3	Ampicillin	S. Milošević
pRAV22-OT-1-A116	MP71-Vektor, polyA ₁₁₆ -Abschnitt OT-1-spez. CDR3, α -Kette AV22	Ampicillin	S. Milošević
pRBV27-OT-1-A116	MP71-Vektor, polyA ₁₁₆ -Abschnitt OT-1-spez. CDR3, β -Kette BV27	Ampicillin	S. Milošević
pcDNA3.1 MLVg/p	gag-/pol-Gen des murinen Leukämie- virus (Mo-MLV)	Ampicillin	C.Baum
pALF-10A1	Verpackungsplasmid (env-Gen des MLV-10A1)	Ampicillin	W.Uckert
pCR TM 4Blunt-TOPO [®]	zur Klonierung stumpf-endiger PCR-Produkte	Ampicillin	Invitrogen

Tabelle II-12 Primer für Antigene

Primer	Sequenz 5' nach 3'
18s RNA	5' CGGCTACCACATCCAAGGAA 3' GCTGGAATTACCGCGGCT
PCTA	5' TAGTAGCTCACACCTCCCCC 3' CAGGCAGCTCCAGTCTCAAA
PRAME	5' ACCTGGAAGCTACCCACCTT 3' AGATGCATCACATCCCCTTC
PSA	5' CCAAGTTCATGCTGTGTGCT 3' GGAGTTGATAGGGGTGCTCA
PSMA	5' AAGAATATGCTTATAGGCGTGGA 3' CCAATTTGCTTATCCTGGGC
STEAP	5' AAAGCAGTTTGGGCTTCTCA 3' GTGCCCAGTAGAAGGGAAACA

Tabelle II-13 Primer für RACE-PCR

Primer	Sequenz 5' nach 3'
TRAC (TCR- α -Kette)	5' CGGCCACTTTCAGGAGGAGGATTCGGAAC
TRBC (TCR- β -Kette)	5' CCGTAGAACTGGACTTGACAGCGGAAGTGG
Nested TRAC	5' CCACAGCACTGTTGCTCTTGAAGTC
Nested TRBC	5' GCTCAGGCAGTATCTGGAGTCATTGA

Tabelle II-14 Primer für Plasmide

Primer	Sequenz 5' nach 3'
T7 (pGEM-Plasmide)	5' TATTACGACTCACTATAGGG
MP71fwd (MP71-Plasmide)	5' GCTCCGCCACTGTCCGAG

Tabelle II-15 Oligonukleotide

DNA-Oligonukleotide	Sequenz 5' nach 3'
TCR-3825 V α -CDR3 sense	GCAGTGGAGCCCGGCGGCAGCTACATCCCCACCTT CGGCCGCGGCACCAGCCTGATCGTG CACCCCTAC ATCCAGAACCCCGAGCCCGCCGTGTACCAGCTGAA GGACCCCCGCAGCCAGGACAGCACCCCT
TCR-3825 V α -CDR3 antisense	GTGCTGTCCTGGCTGCGGGGGTCCTTCAGCTGGTA CACGGCGGGCTCGGGGTTCTGGATG TAGGGGTGC ACGATCAGGCTGGTGCCGCGGCCGAAGGTGGGGA TGTAAGCTGCCGCCGGGC TCCACTGC
TCR-3825 V β -CDR3 sense	GCAAGCAGCCCCGGCCTGAGCTACGAGCAGTACT TCGGCCCCGGCACCCGCCTGACCGTG ACCGAGGA CCTGAGGAACGTGACCCCCCAAG
TCR-3825 V β -CDR3 antisense	GTCACCTTGGGGGGGGTACGTTCCCTCAGGTCCTC GGTCACGGTCAGGCGGGTGCCGGGG CCGAAGTAC TGCTCGTAGCTCAGGCCGGGGCTGCTTGC
TCR-3822 V α -CDR3 sense	GCAATGCGCGTGCAGGGCGCCCAGAAGCTGGTGT TCGGCCAGGGCACCCGCCTGACCATCAACCCCAA CATCCAGAACCCCGAGCCCGCCGTGTACCAGCTG AAGGACCCCAAGCCAGGACAGCACCCCT
TCR-3822 V α -CDR3 antisense	GTGCTGTCCTGGCTTCTGGGGTCCTTCAGCTGGTAC ACGGCGGGCTCGGGGTTCTGGATGTTGGGGTTGAT

	GGTCAGGCGGGTGCCCTGGCCGAACACCAGCTTCT GGGCGCCCTGCACGCGCATTGC
TCR-3822 V β -CDR3 sense	GCAAGCAGCTACGGCACCGGCCACAACGAGCAGT TCTTCGGCCCCGGCACCCGCCTGACCGTGCTGGAG GATCTGAGGAACGTGACCCTCCTCAAG
TCR-3822 V β -CDR3 antisense	GTCACCTTGAGGAGGGTCACGTTCTCAGATCCTC CAGCACGGTCAGGCGGGTGCCGGGGCCGAAGAAC TGCTCGTTGTGGCCGGTGCCGTAGCTGCTTGC

1.8 Peptide

Tabelle II-16 Peptide zur Immunisierung von ABabDII Mäusen

Protein	Peptidsequenz	Quelle
MART-1	ELAGIGILTV	Metabion
PCTA	IMVLKDKFQV	Metabion
PRAME	SLLQHLIGL	Metabion
PSA	FLTPKKLQCVDLHVISNDVCAQV	Metabion
PSCA	ALQPGTALL	Metabion
PSMA	ALFDIESKV	Metabion
STEAP	LLLGTIHAL	Metabion

Tabelle II-17 Peptide der HLA-A2 Selbstpeptid-Bibliothek (Metabion)

(siehe Anhang)

1.9 Antikörper und Tetramer

Tabelle II-18 Antikörper

Spezifität	Konjugation	Isotyp	Klon	Quelle
CD3	FITC	Maus IgG ₁	UCHT1	BD
CD3	APC	Maus IgG ₁	UCHT1	BD
CD4	APC	Maus IgG ₁	13B8.1	Beckman Coulter
CD4 murin	PerCP-Cyanine5.5	Rat IgG2a, kappa	RM4-5	eBioscience
CD8	FITC	Maus IgG ₁	HIT-8a	BD
CD8	APC	Maus IgG ₁	PPA-T8	BD
CD8 murin	APC	Rat IgG2a, kappa	53-6.7	eBioscience
CD8 murin	APC-eFluor 780	Rat IgG2a, kappa	53-6.7	eBioscience
CD137 murin	PE	Golden Syrian Hamster IgG	17B5	eBioscience
IFN γ murin	FITC	Rat IgG2a, kappa	XMG1.2	eBioscience
IFN γ murin	APC	Rat IgG2a, kappa	XMG1.2	eBioscience
FcR-Blockierung	-	-	-	MACS
Mouse IgG F(ab)2	PE	IgG F(ab)2	polyclonal	Jackson
PRAME	-	IgG	polyclonal	Abcam
PSMA	PE	IgG ₁	107-1A4	MBL
TCR β -Kette, C-Region, murin	APC	IgG 2a	H57-597	BD

Tabelle II-19 Tetramer

Bezeichnung	Peptidsequenz	Quelle
HLA-A*02:01/MART-1 _(ELA) /H β 2m	ELAGIGILT	D. Busch

1.10 Personen

(siehe Anhang)

1.11 Software

Tabelle II-21 verwendete Software

Zweck	Software
Textverarbeitung	Microsoft Word
Bildbearbeitung	Adobe Photoshop
	Microsoft Power Point
ELISA-Auswertung	Magellan
FACS-Auswertung	FlowJo 8.6
Datenauswertung	Graph Pad Prism 5.0
	Microsoft Excell
Statistische Auswertung	Graph Pad Prism
Virtuelle Clonierung	Clone Manager 8.0
Sequenzanalyse	IMGT (TCR-Sequenzanalyse)
	NCBI BLAST
	Chromas Lite (Elektropherogramme)
Sequenzoptimierung	Jcat (www.jcat.de)
	Expasy (web.expasy.org/translate/)
Epitop-Analyse	Expitope
	(http://webclu.bio.wzw.tum.de/expitope/)
	Syfpeithi (www.syfpeithi.de)
	BIMAS (http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/)
	IEDB (http://tools.immuneepitope.org/main/html/tcell_tools.html)

1.5 Methoden

2.1 Zellbiologische Methoden

Um Kontaminationen mit Bakterien, Pilzen oder anderen Organismen zu vermeiden, wurden jegliche Arbeiten zur Kultivierung eukaryotischer Zellen unter sterilen Bedingungen und mithilfe steriler Medien, Materialien und Lösungen durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank (Heraeus) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit.

2.1.1 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen mit Trypanblau angefärbt und mithilfe einer Neubauer-Zählkammer unter einem Mikroskop beurteilt und gezählt. Trypanblau ist ein Farbstoff, welcher die Zellmembran lebender Zellen nicht durchdringen kann. Tote Zellen werden jedoch tiefblau angefärbt, wodurch lebende und tote Zellen voneinander unterschieden werden können.

Die Zellsuspensionen wurden im Verhältnis 1:10 mit Trypanblau verdünnt und auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Unter einem Durchlichtmikroskop wurden dann in 4 Großquadraten, bestehend aus je 16 Kleinquadraten, die lebenden Zellen ausgezählt. Die durchschnittliche Zellzahl pro Großquadrat wurde ermittelt und mit dem Verdünnungsfaktor 10 und dem Kammerwert 1×10^4 multipliziert. Daraus ergab sich die Zellzahl in einem Milliliter Zellsuspension.

2.1.2 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen abzentrifugiert, gezählt und in Einfriermedium (Ibidi Freezing Medium, serumfrei oder FBS mit 10% DMSO) aufgenommen. Je 1ml Zellsuspension wurde in 1,8ml Einfriereröhrchen (Cryotubes von Nunc) überführt und mithilfe eines Nalgene® Cryo 1°C Freezing Containers (Thermo Scientific) langsam auf -80°C heruntergekühlt. Zur längerfristigen Lagerung bei -196°C wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff transferiert.

2.1.3 Auftauen von Zellen

Zum Auftauen wurden die gefrorenen Zellsuspensionen mithilfe eines Wasserbades zügig auf Raumtemperatur erwärmt, in vorgewärmtes RPMI 1640 Medium überführt und resuspendiert. Die verdünnten Zellsuspensionen wurden abzentrifugiert und in dem jeweils benötigten, vorgewärmten (37°C) Kulturmedium aufgenommen.

2.1.4 Kultivierung adhärenter Zelllinien

Adhärenente Zelllinien wie z.B. Mel624.38 oder HEK 293T-Zellen wurden in liegenden 75cm² Zellkulturflaschen (BD) mit 20-30ml des jeweils benötigten Zellkulturmediums im Brutschrank (Heraeus) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Alle 2-3 Tage wurden die Zellen je nach Konfluenz und Zelltyp im Verhältnis 1:2 bis 1:10 gesplittet. Dazu wurden die Zellen entweder durch leichtes Abklopfen, oder mithilfe einer Trypsin/EDTA-Lösung gelöst. Zum Lösen mit Trypsin/EDTA wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen und dann für 3-5 Minuten mit 3ml der Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C inkubiert und im Anschluss daran gesplittet. Die Zellkulturflaschen wurden wieder auf ein Endvolumen von mindestens 20ml mit Zellkulturmedium aufgefüllt.

2.1.5 Kultivierung von Suspensionszellen

Nicht adhärenente Zellen wie K562 oder mLCL wurden in stehenden 75cm² Zellkulturflaschen (BD) mit 25-50ml Zellkulturmedium im Brutschrank (Heraeus) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Alle 3-5 Tage wurden die Zellen je nach Dichte und Zelltyp 1:5 bis 1:10 gesplittet und mit frischem Zellkulturmedium versorgt.

2.1.6 Kultivierung etablierter T-Zell-Klone und Stimulation

T-Zell-Klone wurden in 24-Loch-Flachboden-Kulturplatten (BD) in T-Zell-Medium im Brutschrank (Heraeus) bei 37°C, 5%CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die T-Zell-Klone wurden alle 14 Tage restimuliert. Dazu wurden die T-

Zellen geerntet, gezählt, abzentrifugiert und in frischem T-Zell-Medium aufgenommen. 1×10^6 T-Zellen wurden pro Kavität einer 24-Loch-Flachboden-Kulturplatte vorgelegt und restimuliert. Das Stimulationsgemisch pro 1×10^6 T-Zellen bestand für den T-Zell-Klon SW M1-67 aus je 1×10^6 PBL dreier verschiedener Spender (bestrahlt mit 55 Gy, Bestrahlungsanlage ^{137}Cs , HWM-D-2000 Gammacell), 1×10^5 APC (LAZ 388 bestrahlt mit 150Gy), 30ng/ml OKT-3 und 50U/ml IL-2. Der mit T-Zell-Rezeptor 3825 transduzierte T-Zell-Klon SW M1-67 wurde mit 1×10^6 PBL, SLL-Peptid-beladenen T2-Zellen (bestrahlt mit 100Gy), 30ng/ml OKT-3 und 50U/ml IL-2 restimuliert. Alle 2-3 Tage wurde 1ml T-Zell-Medium pro Kavität mit frischem Medium (inkl. IL-2) ausgetauscht und bei Bedarf wurden die T-Zellen 1:2 gesplittet.

2.1.7 Kultivierung von PBMC

Aus Frischblut isolierte humane PBMC (peripheral blood mononuclear cells) wurden mit 50U/ml IL-2 in T-Zell-Medium kultiviert. Zur Stimulation und Anreicherung CD8^+ T-Zellen wurden die PBMC in 14-tägigem Rhythmus mit PHA (3,33 $\mu\text{l/ml}$ eines 75ng/ μl Stocks) stimuliert. Drei Tage nach PHA-Stimulation wurden die PBMC zentrifugiert, dadurch wurde das PHA-haltige Medium entfernt und durch frisches T-Zell-Medium ersetzt. Je nach Dichte wurden die Zellen alle 2-3 Tage 1:2 gesplittet, die IL-2-Konzentration wurde konstant bei 50U/ml gehalten.

2.1.8 Isolierung von PBMC aus Vollblut

Mit Hilfe des synthetischen Copolymers Ficoll (Biochrome) wurden PBMC aus Frischblut durch Zentrifugation über einen Dichtegradienten angereichert.

Dazu wurde das Blut bei Abnahme heparinisiert und direkt im Anschluss im Verhältnis 1:3 mit PBS low endotoxin (Biochrome) verdünnt. Jeweils 35ml des verdünnten Blutes wurden in 50ml Röhrchen langsam über 15ml Ficoll geschichtet. Nach einer Zentrifugation für 18min bei 840g ohne Bremse wurden 15ml der oberen Phase abgenommen und der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt (1.Thrombozytenwäsche). Die Interphasenringe wurden abgenommen und jeweils 2 Interphasenringe wurden in einem 50ml Röhrchen gepoolt und auf

ein Gesamtvolumen von 50ml mit frischem PBS low endotoxin aufgefüllt. Die Röhrchen wurden nun für 10min bei 470g mit Bremse zentrifugiert und anschließend die Zellsedimente aus 2 Röhren in eines gepoolt. Die Röhrchen wurden abermals auf ein Endvolumen von 50ml aufgefüllt und der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt. Nach wiederholtem Poolen zweier Zellsedimente wurden die Röhren mit serumhaltigem PBS (0,5% Humanserum) auf ein Endvolumen von 40ml aufgefüllt und für 15min bei 130g ohne Bremse zentrifugiert (2.Thrombozytenwäsche). Nach Wiederholung dieses Waschschrilles wurden die isolierten PBMC entweder in T-Zell-Medium oder zur anschließenden Generierung Dendritischer Zellen in DC-Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

2.1.9 Generierung maturer Dendritischer Zellen (3d mDC)

Zur Generierung Dendritischer Zellen, mussten aus den PBMC die Monozyten isoliert werden. Dies geschah mittels Plattenadhärenz. Zunächst wurden frisch isolierte PBMC (wie in Abschnitt 2.1.8 beschrieben) in DC-Medium aufgenommen, gezählt, auf eine Konzentration von $60-75 \times 10^6$ Zellen/15ml eingestellt und in eine 80cm²-Nunc™-Surface-Zellkulturflasche (thermo Scientific) überführt. Nach leichtem Schwenken wurden die Zellen in der liegenden Zellkulturflasche bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Dabei setzen sich die in den PBMC enthaltenen Monozyten am Flaschenboden fest, während sich die PBL im Überstand befanden. Nach 50 min wurde der Überstand mit den PBL gesammelt und die adhärennten Zellen 2x mit frischem DC-Medium gewaschen. Nachdem das Waschmedium wieder abgenommen wurde, wurden die Zellkulturflaschen mit 25ml frischem DC-Medium substituiert. Durch Zugabe von GM-CSF (100ng/ml) und IL-4 (20ng/ml) wurde die Ausdifferenzierung der Monozyten zu immaturren Dendritischen Zellen initiiert. Nach Zugabe der Zytokine wurden die Zellen in den liegenden Zellkulturflaschen bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach 48h wurden pro Flasche 6ml frisches DC-Medium mit einem Maturierungscocktail zugegeben, um die Reifung der immaturren DC zu maturaen DC zu stimulieren (siehe Tabelle II-22). Weitere 24h später wurden die maturaen DC geerntet und konnten verwendet werden.

Tabelle II-22 Generierung maturer DC innerhalb von 3 Tagen

	Tag 0	Tag 2	Tag 3
Zytokine:	GM-CSF (100ng/ml) IL-4 (20ng/ml)	GM-CSF (100ng/ml) IL-4 (20ng/ml) IL-1 β (10ng/ml) TNF- α (10ng/ml) IFN- γ (5000U/ml) R848 (1 μ g/ml) PGE ₂ (250ng/ml)	Ernte

2.1.10 Transfektion verschiedener Zelllinien

Zur Transfektion von Zellen mittels Elektroporation wurden die jeweiligen Zellen zunächst geerntet, das Zellkulturmedium wurde bei 470g abzentrifugiert und die Zellen wurden 2x mit kaltem (4°C) OptiMEM gewaschen. Nach dem zweiten Waschschrift wurden die Zellen in kaltem OptiMEM resuspendiert, gezählt und je nach Zelltyp auf eine bestimmte Konzentration eingestellt. 300 μ l der Zellsuspension wurden in 4mm Elektroporationsküvetten (Biorad) überführt, die jeweils benötigte *ivt*-mRNA (oder das entsprechende Volumen H₂O als Negativkontrolle) wurde der Zellsuspension vorsichtig beigemischt und die Zellen wurden mithilfe eines Gene Pulser Xcell™ Elektroporators (Biorad) transfiziert. Je nach zu transfizierender Zelllinie wurden unterschiedliche Elektroporationsprotokolle verwendet (Tabelle II-23).

Tabelle II-23 Elektroporation verschiedener Zelllinien

Zellen	Konzentration	Elektroporationsprotokoll
DC	10-12x10 ⁶ /ml	exponential protocol 300V 300 μ F
mLCL	10x10 ⁶ /ml	exponential protocol 300V 150 μ F
PBMC	10x10 ⁶ /ml	time constant protocol 760V 2,4ms

K562	10-12x10 ⁶ /ml	exponential protocol 300V 300µF
K562 A2	10-12x10 ⁶ /ml	exponential protocol 300V 150µF

Direkt nach der Elektroporation wurden die Zellen aus den Elektroporationsküvetten in 6-Loch-Flachboden Kulturplatten (Nunc) mit vorgewärmtem Medium überführt und dann bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.1.11 Transfektion von HEK-293T-Zellen

Um für die Transduktion von PBL oder T-Zell-Klonen infektiöse Virushüllen zu generieren, welche Plasmide mit der DNA bestimmter TCR α - und TCR β -Ketten tragen, wurden HEK-293T-Zellen verwendet. Sie wurden mit dem Plasmid pcDNA3.1MLVg/p (gag/pol-Gen des murinen Leukämievirus (Mo-MLV)) und dem Verpackungsplasmid pALF-10A1 (env-Gen des MLV-10A1) sowie dem TCR α / β -kodierenden retroviralen Vektor transfiziert (Reuß et al., 2007).

Für den Polyethylenimin-(PEI)-vermittelten Plasmid-Transfer (PEI-Transfektion) in Zellen der Linie HEK-293T wurden am Tag vor der Transfektion 3x10⁶ HEK-293T-Zellen in 18ml HEK-293T-Zell-Medium ohne Zusatz von Antibiotika in Zellkulturplatten (Nunc, 10cm im Durchmesser) ausgesät. Pro Transfektionsansatz wurden 10µg pALF, 10µg pgag/pol mit 10µg TCR α - oder 10µg TCR β -Plasmid-DNA in 600µl OptiMEM gemischt. Nach Zugabe von 67,5µl 1xPEI (1mg/µl, pH 7,0) und wiederholtem Mischen wurde das Transfektionsgemisch für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Das Medium der HEK-293T-Zellen wurde entfernt, das Transfektionsgemisch wurde zu 18ml frischem 293T-Zell-Medium (ohne Antibiotikum) gemischt und auf die HEK-293T-Zellen gegeben. Dazu wurde das Medium sehr vorsichtig vom Rand aus über die Zellen geschichtet, um ein Ablösen der Zellen zu vermeiden.

Nach 2-tägiger Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurde der nun virushaltige Überstand von den HEK-Zellen abgenommen und durch einen 0,45µm Filter (Millipore) filtriert, um eine mögliche Kontamination mit HEK-Zellen zu verhindern. Das von den transfizierten Zellen abgenommene Medium wurde

durch frisches ersetzt. Der frische Virusüberstand wurde sofort für die erste Transduktion von PBL oder T-Zell-Klonen verwendet. 24h später wurde ein zweites Mal der Virusüberstand der HEK-293T-Zellen abgenommen, filtriert und für die zweite, Retronectin-vermittelte Transduktion der PBL oder T-Zell-Klone verwendet.

2.1.12 Transduktion von PBL

Zur Transduktion von PBL mit der DNA bestimmter TCR α - und TCR β -Ketten wurden frisch isolierte PBL (siehe Abschnitte 2.1.8 und 2.1.9) verwendet. Diese wurden zu je 1×10^6 Zellen pro Kavität in einer 24-Loch-Flachboden-Kulturplatte ausgesät. Die Zellen wurden in 2ml T-Zell-Medium mit 50U/ml IL-2 kultiviert und mit 3,33 μ l/ml PHA (75 μ g/ μ l) stimuliert. 3 Tage nach Stimulation wurde das PHA-haltige T-Zell-Medium abgenommen und durch 2 ml frischen Virusüberstand ersetzt, welcher sich aus 1ml TCR α - und 1ml TCR β -haltigem retroviralem Überstand zusammensetzte. Dem Überstand wurden noch 50U/ml IL-2 und 4 μ g/ml Protaminsulfat zugesetzt. Die Platten wurden 90min bei 32°C und 800xg zentrifugiert und anschließend bei 37°C in den Brutschrank gestellt.

Für die zweite Transduktion der PBL wurden Retronectin-beschichtete 6-Loch-Flachboden-Kulturplatten verwendet. Die Kavitäten dieser Platten wurden mit je 2ml Retronectin-haltigem (12 μ g/ml) PBS entweder für 2h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C beschichtet. Nach der Beschichtung wurde das Retronectin abgenommen und jede Kavität mit 1,5ml 2% BSA-Lösung für 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die BSA-Lösung abgenommen, die Platten mit PBS (mit 2,5% 1M HEPES) gewaschen und je Kavität der 6-Loch-Flachboden-Kulturplatte wurden 3ml frischer Virusüberstand zugegeben (1,5ml TCR α - und 1,5ml TCR β -Kette). Der Virusüberstand wurde nun für 90min bei 4°C und 4000xg und direkt anschließend für 30min bei 32°C und 4000xg in die Platten zentrifugiert. Im Anschluss daran wurden 2ml des Virusüberstands wieder abgenommen und verworfen und die PBL aus den 24-Loch-Flachboden-Kulturplatten wurden in die 6-Loch-Flachboden-Kulturplatten transferiert (24h nach der ersten Transduktion). Es wurden zusätzlich 4ml frisches T-Zell-Medium mit 50U/ml IL-2 und 4 μ g/ml Protaminsulfat zugesetzt. Nun wurden die Platten nochmals für 10min bei 32°C und 2000xg zentrifugiert und dann wieder bei 37°C im Brutschrank inkubiert. 3 Tage nach der 2. Transduktion konnten die PBL aus

den 6-Loch-Flachboden-Kulturplatten gesammelt und in liegende 75cm² Zellkulturflaschen überführt werden. Die transduzierten PBL wurden dabei stets in T-Zell-Medium mit 50U/ml IL-2 kultiviert. 5 Tage nach der 2. Transduktion konnte die Transduktionseffizienz im FACS analysiert werden, durch extrazelluläre Färbung der C-Region der murinen TCR β -Kette mittels eines spezifischen Antikörpers. Zum gleichen Zeitpunkt konnten die transduzierten PBL für erste Funktionsanalysen eingesetzt werden.

2.1.13 Transduktion von T-Zell-Klonen

Die erste retrovirale Transduktion von T-Zell-Klonen bekannter (endogener) Spezifität mit einem transgenen T-Zell-Rezeptor neuer Spezifität erfolgte 6 Tage nach Inkulturnahme und spezifischer Stimulation der T-Zellen. Ansonsten erfolgte die Transduktion der T-Zellen entsprechend der Transduktion von PBL. Auch hier konnte 5 Tage nach der 2. Transduktion die Transduktionseffizienz mittels Antikörperfärbung im FACS ermittelt und erste Funktionsanalysen durchgeführt werden.

2.1.14 Peptidbeladung von T2-Zellen

Die Peptidbeladung von T2-Zellen erfolgte entweder in 1,5ml Reaktionsgefäßen oder in 96-Loch-Rundboden-Zellkulturplatten. Dazu wurden die T2-Zellen ($2,5 \times 10^5$ /ml) in LCL-Medium für 1,5h bei 37°C im Brutschrank mit den Peptiden inkubiert. Die Beladung mit den Peptiden der HLA-A2-Selbstpeptid-Bibliothek (Sommermeyer et al., 2013) erfolgte in 96-Loch-Platten mit einer Peptidkonzentration von 10^{-5} M, die Peptidbeladung für alle anderen Spezifitätstests erfolgte in 1,5ml Reaktionsgefäßen mit Peptidkonzentrationen von 10^{-5} M bis 10^{-11} M.

2.1.15 Coinkubation von T-Zellen mit APC

Zum Ansetzen einer Cokultur mit anschließender Bestimmung der Zytokinfreisetzung im ELISA wurden T-Zellen verwendet, die sich zur optimalen Reaktivierung in der Ruhephase am Ende ihres Proliferationszyklus (Tag 11-14

nach Stimulation) befanden. Zur Vermeidung einer unspezifischen Zytokinsekretion wurden die T-Zellen vor Verwendung für eine Cokultur für mindestens 2 Tage in T-Zell-Medium ohne Zusatz von IL-2 kultiviert.

Zur Coinkubation von T-Zellen mit APC wurden die Zellen in 15ml Reaktionsgefäßen sedimentiert, in T-Zell-Medium ohne IL-2 resuspendiert, gezählt und auf die jeweils gewünschte Zellzahl/ml eingestellt. Die Effektor- und Zielzellen wurden in 96-Loch-Rundboden-Zellkulturplatten im gewünschten Verhältnis zueinander gemischt, die Kavitäten wurden auf ein Endvolumen von 200µl mit T-Zell-Medium ohne IL-2 aufgefüllt. Die Cokulturen wurden anschließend bei 37°C im Brutschrank inkubiert, 22-24h nach Ansatz der Cokultur wurden die Überstände abgenommen, um die Zytokinkonzentration im Überstand zu ermitteln. Die Überstände wurden entweder frisch eingesetzt oder nach kurzfristiger Aufbewahrung bei -20°C. Auch zur längerfristigen Aufbewahrung wurden die Überstände bei -20°C gelagert.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten elektrokompenten Bakterien waren *Escherichia coli* (*E.coli*) des Stammes XL1-Blue MRF'(Stratagene). Die Bakterien wurden stets bei 37°C kultiviert, entweder ausplattiert auf Agarplatten in einem Inkubator oder als flüssige Bakterienkulturen in einem beheizbaren Schüttler. Um Plasmid-tragende Bakterien zu selektieren, wurden Plasmide mit Ampicillin-Resistenzkassetten verwendet und dem Kultur-Medium bzw. -Agar stets Ampicillin (50µg/ml) zugesetzt. Für die langfristige Lagerung dieser Bakterien wurden die Bakteriensuspensionen mit 20% Glycerin versetzt und bei -80° aufbewahrt.

Die in dieser Arbeit verwendeten chemisch kompetenten Bakterien gehörten alle zum Stamm *E.coli* Mach1™-T1®. Die Bakterien wurden stets bei 37°C kultiviert, entweder ausplattiert auf Agarplatten in einem Inkubator oder als flüssige Bakterienkulturen in einem beheizbaren Schüttler. Um Plasmid-tragende

Bakterien zu selektieren wurden pCR™4Blunt-TOPO®-Vektoren mit Ampicillin-Resistenzkassetten verwendet und dem Kulturmedium bzw. Kulturagar wurde Ampicillin (50µg/ml) zugesetzt.

2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Mittels Gelelektrophorese wurden DNA-Fragmente in 1%-igen Agarosegelen bei 5-10V/cm aufgetrennt. Zur Auftrennung kleiner Fragmente (100bp-500bp) wurden 1,5%-ige Agarosegele verwendet. Zur Herstellung der Gele wurde das Agarosepulver mit dem benötigten Volumen 1xTAE-Puffer versetzt, in einem Mikrowellengerät erhitzt und mit 0,4µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Zur Evaluierung der Fragmentgröße der DNA-Proben wurde ein mit Restriktionsenzymen geschnittener DNA-Leiter entsprechender Größe aufgetragen (100bp-plus oder 1kb-plus DNA-Standard von Fermentas). Mit Hilfe eines UV-Transilluminators wurden die DNA-Banden im UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert.

2.2.3 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente nach einer Gelelektrophorese aus dem Agarosegel zu extrahieren, wurden die Banden mittels UV-Transilluminator sichtbar gemacht. Mit einem Skalpell wurden die Banden möglichst präzise aus dem Gel ausgeschnitten und mithilfe des „QIAquick® Gel-Extraction-Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aus dem Gel eluiert und aufgereinigt.

2.2.4 Sequenzierungen

Die Sequenzierung von DNA-Proben wurde kommerziell von der Firma MWG (Ebersberg) durchgeführt. Zur Auswertung der erhaltenen Elektropherogramme wurde das Programm Chromas Lite (Technelysium) verwendet.

2.2.5 DNA-Restriktionsverdau

Zur Klonierung gewünschter DNA-Fragmente in Vektoren, wurden sowohl die

Fragmente als auch die Vektoren mithilfe von Restriktionsenzymen einem Verdau unterzogen. Durch Verwendung gleicher Enzyme für den Verdau von Vektor und Fragment, wurden, als Voraussetzung für die Klonierung, an den Schnittstellen identische Enden erzeugt. Pro Ansatz eines Restriktionsverdaus wurden 20µg DNA mit 10µl 10xPuffer und je 30U Enzym auf ein Gesamtvolumen von 100µl mit H₂O dest. aufgefüllt. Die Restriktionsansätze wurden durch Auf- und Abpipettieren gründlich gemischt und dann für 1,5h bei 37°C in einem Heizblock verdaut. Im Anschluss an den Verdau wurden die jeweiligen Ansätze auf ein Agarosegel aufgetragen und nach Durchführung einer Gelelektrophorese wurde die Qualität des Verdaus (Vollständigkeit und Fragmentgröße) beurteilt.

2.2.6 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Zur Erzeugung doppelsträngiger DNA-Fragmente mit gewünschter Nukleotidsequenz, wurde die Herstellung synthetischer einzelsträngiger DNA-Oligonukleotide bei der Firma Sigma-Aldrich in Auftrag gegeben. Die in lyophilisierter Form gelieferten einzelsträngigen Oligonukleotide wurden in H₂O dest. gelöst (100nM). Zur Erzeugung der doppelsträngigen DNA-Fragmente wurden Strang- und Gegenstrang-Oligonukleotide im Verhältnis 1:1 gemischt und für 5-10min auf 95°C erhitzt. Nach langsamem Abkühlen der Ansätze auf Raumtemperatur (Dauer: etwa 2h) konnten die hybridisierten Oligonukleotide für die Ligation in die entsprechenden Vektoren mit identischen Überhängen verwendet werden. Zur längerfristigen Lagerung wurden die Oligonukleotide bei -20°C aufbewahrt.

2.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation eines DNA-Fragments in einen passenden Vektor wurde das Enzym T4-Ligase verwendet. Dazu wurden DNA-Fragment und Plasmid im Verhältnis 1:3 gemischt und in einem Ansatz mit 1µl T4-Ligase Puffer (10x, NEB), 1U T4-Ligase (NEB) und H₂O ad 10µl über Nacht bei 16°C ligiert.

2.2.8 Generierung der Vektorkonstrukte zur Re-Expression spezifischer T-Zell-Rezeptoren

Ein wichtiger Punkt dieser Arbeit war es, die isolierten T-Zell-Rezeptoren zu re-exprimieren und Funktionsanalysen durchzuführen. Diese Re-expression erfolgte zum einen mittels einer transienten TCR-Expression, vermittelt durch für die TCR α - und - β -Ketten kodierende *in-vitro* transkribierte mRNA (*ivt*-RNA). Zum anderen wurden für eine stabile TCR-Expression retrovirale Vektoren verwendet. Die verwendeten Vektoren stammten aus einer TCR-Bibliothek (bereitgestellt von S. Milošević), bestehend aus einzelnen Vektoren, in die jeweils eine andere variable TCR-Kette, zusammen mit einer Platzhalter-CDR3-Region (OT1-spezifisch) und einer murinisierten C-Region kloniert waren. Die Bibliothek enthält Vektoren mit allen variablen TCR α -Ketten und allen variablen TCR β -Ketten. Als Vektoren dienen dabei sowohl ein retroviraler MP71-Vektor als auch ein modifizierter pGEM-A116-Vektor (Restriktionsschnittstellen-modifiziert von S. Milošević). Dieser Vektor weist eine multiple Klonierungssequenz (MCS, multiple cloning site), eine poly-Adenin-Folge von 116 Nukleotiden (A116) 3'strangabwärts der MCS und einen T7-Promotor 5'strangaufwärts der MCS auf. Des Weiteren befindet sich 3'strangabwärts des A116-Abschnittes eine *SpeI*-Schnittstelle, die eine Linearisierung des pGEM-Vektors und die Herstellung von *ivt*-RNA mithilfe eines mMESSAGE mMACHINE™ T7 Kits (Ambion) ermöglicht.

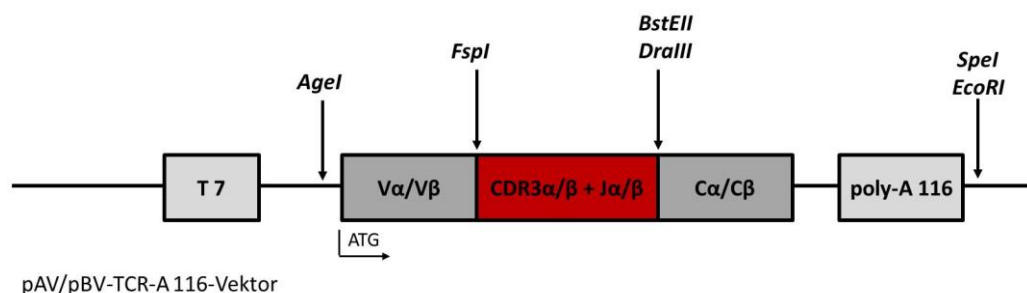


Abbildung I-1: TCR-Kassette der TCR-Bibliothek am Beispiel des pGEM-A116-Vektors

Dargestellt ist die MCS, die zwischen dem T7-Promotor und der Poly-Adenin-Folge aus 116 Nukleotiden liegt. Markiert sind die für die Clonierungen wichtigen Restriktionsschnittstellen (*AgeI*, *FspI*, *BstEII*, *DraIII*, *EcoRI*) und die für die Linearisierung des Vektor benötigte Restriktionsschnittstelle (*SpeI*).

Um nun Plasmide mit der kompletten Sequenz einer bestimmten TCR α - oder - β -Kette auszustatten, wurden für die CDR3-Region (inkl. J/(D)-Region) der TCR-Kette kodierende einzelsträngige DNA-Oligonukleotide in Auftrag gegeben (Sigma-Aldrich). Es wurden Strang- und Gegenstrang-Oligonukleotide sequenzoptimiert und mit definierten Restriktionsschnittstellen ausgestattet. Diese waren am 5' Ende *FspI* (blunt end) und am 3' Ende *DraIII* (für TCR α -Kette, 3' Überhang NNN) bzw. *BstEII* (für TCR β -Kette, 5' Überhang GTNAC). Nach Hybridisierung der Strang- und Gegenstrang-Oligonukleotide und Restriktionsverdau der Vektoren mit den gleichen Enzymen (dadurch Entfernung der Platzhalter-CDR3 und Erzeugung identischer kompatibler Überhänge) konnten nun die spezifischen CDR3-Regionen in die Vektoren mit der benötigten V α /V β -Kette ligiert werden (siehe Abschnitt 2.2.7).

2.2.9 Transformation elektrokompenter Bakterien mit Plasmid-DNA

Zur Amplifikation von Ligationsprodukten wurden elektrokompente *E. coli* Bakterien vom Stamm XL1-Blue MRF'(Stratagene) verwendet. Die bei -80°C gelagerten Bakterien wurden hierzu langsam auf Eis aufgetaut. 20 μ l der Bakteriensuspension wurden vorsichtig, unter Vermeidung von Blasenbildung, mit 1 μ g Plasmid-DNA vermischt und in geeignete Küvetten überführt (0,1cm GenePulser-Küvetten). Mithilfe eines Elektroporators (GenePulser) wurden die Bakterien mit 1,8kV elektroporiert und dann unverzüglich in 1ml warmes SOG-Medium aufgenommen und in 1,5ml Reaktionsgefäße transferiert. Die frisch elektroporierten Bakterien wurden zuerst für 1h bei 37°C in einem Heizblock inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Bakteriensuspension für 10min bei 980xg zentrifugiert, 800 μ l des Überstandes wurden verworfen und das Bakteriensediment in den verbliebenen 200 μ l wieder resuspendiert. Die Bakterien wurden auf vorgewärmte (37°C), Ampicillin-haltige Agarplatten (LB-Medium, SELECT Agar[®], 100 μ g/ml Ampicillin) ausgestrichen und dann über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.2.9 Transformation chemisch kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA

Neben der elektrischen Transformation wurde in dieser Arbeit auch die chemische Transformation geeigneter Bakterien verwendet, um Vektoren mit bestimmten DNA-Sequenzen zu vervielfältigen. Hierzu wurden die Bakterien des „One Shot[®] Mach1[™]-T1[®] chemically Competent *E.coli*“-Kits (Invitrogen) verwendet, die Transformation wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Je Transformation wurde ein Aliquot der Bakterien langsam auf Eis aufgetaut. 5µl der Plasmid-DNA wurde in den Reaktionsgefäßen der Bakteriensuspension vorsichtig (ohne Auf- und Abpipettieren) beigemischt. Die Bakterien wurden 30min auf Eis inkubiert, dann für 30 Sekunden bei 42°C in einem Wasserbad „Hitze-geschockt“ und wieder für 2min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 250µl warmem (Raumtemperatur) S.O.C. Medium wurden die Reaktionsgefäße für 1h bei 37°C inkubiert und bei 225rpm horizontal geschüttelt. Im Anschluss daran wurde die Bakteriensuspension auf vorgewärmten Agar-Platten (LB-Medium, SELECT[®] Agar) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Da auch die für die chemische Transformation verwendeten Vektoren eine Ampicillin-Resistenzkassette enthielten, wurde hier ebenfalls Ampicillin (100µg/ml Agar) zur Selektion erfolgreich transformierter Bakterien verwendet.

2.2.11 Selektion und Expansion transformierter Bakterien

Durch das in den Agarplatten enthaltene Ampicillin wurde auf solche Bakterien selektiert, welche durch eine erfolgreiche Transformation das Plasmid mit einer Ampicillin-Resistenzkassette erhalten hatten. Von den über Nacht gewachsenen Kolonien wurden mehrere mit sterilen 10µl Filter-Pipettenspitzen gepickt und zur Vorkultivierung in 5ml LB-Medium (mit 100µg/ml Ampicillin) überführt. Diese Vorkulturen wurden über Nacht bei 37°C und 190rpm im Brutschrank geschüttelt. Je 1ml dieser Vorkulturen wurde abgenommen, die Plasmid-DNA wurde extrahiert (siehe Abschnitt 2.2.12) und mit den entsprechenden Primern zur Sequenzanalyse an die Firma MWG (Ebersberg) geschickt. Bis zum Erhalt der Sequenziererergebnisse wurden die Vorkulturen bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Aus Vorkulturen, in deren Plasmiden die gewünschte DNA-Sequenz enthalten war, wurden nun in 2l Erlenmeyerkolben 400ml LB-Medium (mit 100µg/ml

Ampicillin) angeimpft. Für eine solche Bakterien-Expansion konnten nicht nur frisch transformierte, sondern auch bereits cryokonservierte Bakterien verwendet werden. Dazu wurden die bei -80°C weggefrorenen Bakterien-Stocks auf Eis leicht angetaut und $5\mu\text{l}$ der Bakterien wurden in 400ml LB-Medium (mit $100\mu\text{g/ml}$ Ampicillin) in einem 2l Erlenmeyerkolben überführt. Die Erlenmeyerkolben mit dem angeimpften Medium wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert und mit 190rpm geschüttelt. Im Falle einer erstmals durchgeführten Transformation wurden am nächsten Morgen $800\mu\text{l}$ der Bakteriensuspension mit 20% Glycerin versetzt und als Kryokonserven bei -80°C eingelagert. Die restliche Bakteriensuspension wurde zur Isolierung der Plasmid-DNA verwendet.

2.2.12 Extraktion von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien

Die über Nacht im Selektionsmedium kultivierten, transformierten Bakteriensuspensionen wurden für 10min bei $5100\times g$ und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die im Bakteriensediment enthaltene Plasmid-DNA wurde, je nach Anwendung, mithilfe des JETstar Plasmid Purification MINI Kits (zur analytischen Aufreinigung, Genomed) oder JETstar Plasmid Purification MAXI Kits (zur präparativen Extraktion, Genomed) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.2.13 Linearisierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA

In Vorbereitung auf die Herstellung von *in-vitro* transkribierter mRNA musste die gewünschte Plasmid-DNA, welche als Vorlage zur Herstellung der Transkripte dienen sollte, linearisiert werden. Hierfür wurden $20\mu\text{g}$ der Plasmid-DNA in einem $100\mu\text{l}$ -Ansatz über Nacht bei 37°C in einem Heizblock mithilfe des Enzyms *SpeI* linearisiert. Dieser Verdau wurde am nächsten Morgen mit $5\mu\text{l}$ $0,5\text{M}$ EDTA, $10\mu\text{l}$ 3M Na-Acetat und $100\mu\text{l}$ Ethanol (100%) abgestoppt. Der Ansatz wurde für mindestens 30min bei -20°C gelagert und anschließend für 15min mit $15000\times g$ bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet in $40\mu\text{l}$ Nuklease-freiem H_2O aufgenommen. Mithilfe eines UV/Vis-Spektralphotometers (NanoDrop ND-1000, PEQLAB) wurde der genaue DNA-

Gehalt (OD_{260}) bestimmt.

2.2.14 Herstellung von *ivt*-mRNA

Zur Herstellung von Einzel-Spezies-*ivt*-mRNA wurde das „mMessage mMachine T7 Kit“ (Ambion) eingesetzt. Als Vorlage für die Herstellung der gewünschten mRNA wurden 2µg der linearisierten und aufgereinigten Plasmid-DNA eingesetzt. Nach Angaben des Herstellers wurde die Plasmid-DNA mit allen weiteren benötigten Reagenzien vermischt und die Ansätze wurden für 2h bei 37°C im Heizblock inkubiert. Durch Zugabe des Enzyms DNase, und weitere Inkubation bei 37°C für 30min, wurde dann die in den Ansätzen vorhandene DNA entfernt. Die so erhaltene *ivt*-mRNA wurde nun mithilfe des RNeasy Mini Kits (QIAGEN) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Dabei wurde die mRNA im letzten Schritt mit 25µl Nuklease-freiem H₂O aus den Säulen eluiert und der RNA-Gehalt spektral photometrisch (OD_{260}) bestimmt. Die so hergestellte mRNA konnte bei -20°C für mehrere Wochen gelagert werden.

2.2.15 Agarose-Gelelektrophorese von *ivt*-mRNA-Produkten

Zur Kontrolle von Qualität und richtiger Größe der *in-vitro* transkribierten mRNA-Produkte wurde jeweils eine Probe der mRNA auf ein RNA-Agarosegel (1% Agarose, 1% Ethidiumbromid, 1xTAE-Puffer hergestellt aus mit DEPC-behandeltem H₂O) geladen. 0,5µg der *ivt*-mRNA wurden in einem 10µl-Ansatz mit H₂O und Ladepuffer versetzt und zur Lösung möglicher Sekundärstrukturen für 10min bei 70°C in einem Heizblock inkubiert. Die Proben wurden gemeinsam mit einer RNA-Leiter (RiboRuler™ High Range RNA Ladder, Thermo Scientific) zur Längenkontrolle auf das RNA-Gel aufgetragen und in einer Elektrophorese-Kammer (gefüllte mit 1xTAE-Puffer, hergestellt aus mit DEPC-behandeltem H₂O) bei 80V für 45min aufgetrennt. Im Anschluss daran wurden die Banden mit einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und dokumentiert.

2.2.16 Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren (DNA oder RNA) wurde durch Messung der optischen Dichte bei 260nm (OD_{260}) im UV/Vis-Spektralphotometer (NanoDrop ND-1000, PEQLAB) bestimmt. Durch zusätzliche Messung der OD bei 280nm (OD_{280}) und bei 230nm (OD_{230}), wo das Absorptionsmaximum von Proteinen, Phenolen und Salzen liegt, und Berechnung des OD_{260}/OD_{280} - bzw. OD_{260}/OD_{230} -Quotienten kann eine Aussage über die Reinheit der gemessenen Nukleinsäure-Lösung getroffen werden. Der OD_{260}/OD_{280} -Wert sollte für reine DNA-Lösungen bei 1,8, für reine RNA-Lösungen zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Die OD_{260}/OD_{230} -Werte sollten sowohl für DNA- als auch für RNA-Lösungen >2,0 sein.

2.3 Analytische Methoden

2.3.1 IFN- γ ELISA

Zur Durchführung eines funktionellen IFN- γ ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) wurden die Reagenzien des „OptEIA™ Human ELISA Sets, IFN- γ “ (BD) verwendet. Zuerst wurde eine 96-Loch-ELISA-Platte (Nunc-Immuno™ MicroWell™ 96 Well von Nunc) mit Beschichtungspuffer und IFN- γ -Capture-Antikörper (Verhältnis 200:1, 50 μ l/well) belegt, versiegelt und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Alternativ konnte diese Beschichtung auch für 1,5h bei 37°C im Brutschrank durchgeführt werden. Anschließend wurden die beschichteten Platten 3x mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und die Vertiefungen mit 300 μ l Milchpulverlösung (PBS mit 1% Milchpulver) für 1h bei Raumtemperatur blockiert. Die Platten wurden wiederum 3x mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und die Überstände der auszuwertenden Kokulturen in Dupletten auf die ELISA-Platten übertragen. Zusätzlich wurde auf jede zu messende Platte eine in Dupletten angelegte Verdünnungsreihe mit definierter IFN- γ -Konzentration (Standard) aufgetragen. Nach 2h Inkubation bei

Raumtemperatur wurden die Platten 5x mit ELISA-Waschpuffer gewaschen. Der IFN- γ -Detection-Antikörper und das Avidin-HRP-Konjugat wurden nun je im Verhältnis 1:200 in 1%ige Milchpulverlösung gemischt und jede Vertiefung der ELISA-Platte wurde mit 50 μ l dieser Lösung befüllt. Die Platten wurden nun 1h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 7x mit ELISA-Waschpuffer gewaschen. Je Vertiefung wurden nun 100 μ l Substratlösung (OptiEIA™ TMB Substrate Reagent A und Substrate Reagent B im Verhältnis 1:1 gemischt) zugegeben und im Dunkeln bei Raumtemperatur 10-15min inkubiert. Mit je 50 μ l pro Vertiefung 1M Phosphorsäure wurde die Farbreaktion abgestoppt. Direkt im Anschluss wurden durch Absorptionsmessung bei 450nm mittels Spektralphotometer (ELISA Reader Sunrise, Tecan, Wellenlängenkorrektur bei 620nm) die Zytokinkonzentrationen gemessen und mithilfe der bekannten Standardwerte die entsprechenden Werte berechnet (Magellan Software).

2.3.2 Chrom-Freisetzungs-Test

Die Evaluierung von CD8-T-Zellen auf ihre Fähigkeit, Zielzellen (welche einen spezifischen Komplex aus Peptid und MHC-Klasse-I-Protein tragen) zu erkennen und zu lysieren (spezifische Lyse), wurde mithilfe von Chrom-Freisetzungs-Tests durchgeführt. Dieser Test beruht auf der Freisetzung von radioaktivem $^{51}\text{Chrom}$. Lebende Zellen nehmen $^{51}\text{Chrom}$ in Form von Natriumchromat ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$) zwar auf, geben es aber nicht spontan wieder ab. Werden mit $^{51}\text{Chrom}$ markierte Zielzellen nun aber von Effektorzellen erkannt und abgetötet, so wird das Natriumchromat wieder frei und kann im Überstand gemessen werden (Janeway et al., 2009).

Für diese Arbeit wurden alle verwendeten Zielzellen zu je 2×10^6 Zellen in 100 μ l FCS aufgenommen und mit 40 μ l frischem Chrom markiert und für 1,5h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde der Chrom-haltige Überstand abgesaugt und die Zellen wurden 2x mit je 5ml LCL-Medium gewaschen (Zentrifugation für 10min bei 470xg). Danach wurden die Zellen wieder in Medium aufgenommen, gezählt und auf die gewünschte Zellzahl/ml eingestellt.

Als Effektorzellen wurden durch PHA-Stimulation CD8-angereicherte PBL (12 Tage nach Stimulation) verwendet, welche durch Elektroporation mit *ivt*-mRNA mit der TCR α - und TCR β -Kette des PRAME-spezifischen TCR 3825 transfiziert

wurden. Als Negativkontrolle dienten mit H₂O elektroporierte PBL. Die Cokultivierung der Effektorzellen mit den radioaktiv markierten Zielzellen erfolgte in 96-Loch-Rundboden-Platten (TPP), wobei jede Zielzelle mit 4 verschiedenen Konzentrationen an Effektorzellen (1:80; 1:40; 1:20; 1:10) kokultiviert wurde, jeweils angesetzt als Dupletten in insgesamt 200µl LCL-Medium pro Vertiefung. Die Cokultur wurde für 4h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss daran wurden je 50µl Überstand pro Vertiefung abgenommen und auf 96-Loch-LUMA-Platten (LumaPlate TM96, PerkinElmer) übertragen. Zur Ermittlung der spontanen ⁵¹Chrom-Freisetzung (Sponti) durch die Zielzellen wurden jeweils 4 Vertiefungen der LUMA-Platten mit 50µl Überstand der Zielzellen (ohne Cokultur mit Effektorzellen) belegt. Zur Ermittlung der maximal möglichen ⁵¹Chrom-Freisetzung (Maxi) wurden je 4 Vertiefungen der LUMA-Platten direkt mit 50µl der markierten Zielzellen belegt. Die auf die LUMA-Platten übertragenen Überstände wurden über Nacht bei Raumtemperatur eintrocknen gelassen und am nächsten Morgen dann die Menge an freigesetztem ⁵¹Chrom gemessen (TopCount NXT™ Microplate Scintillation and Luminescence Counter, PerkinElmer). Wie viel Prozent der Zielzellen durch spezifische Lyse nun das im Zellinneren enthaltene ⁵¹Chrom freigesetzt haben, wurde anhand folgender Formel ermittelt:

$$\frac{\text{Maxi} - \text{Messwert} \times 100}{\text{Maxi} - \text{Sponti}} = \% \text{ spezifische Lyse}$$

2.4 Durchflusszytometrie

2.4.1 Färbung extrazellulärer Proteine

Zum Nachweis der Expression verschiedenster Oberflächenmoleküle wurden direkt fluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet. Alternativ wurden unmarkierte Antikörper verwendet, welche dann in einem zweiten Schritt mit einem Antikörper-spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörper gefärbt wurden. Für diese Färbungen wurden 0,1 – 1 x 10⁶ Zellen 1x mit FACS Puffer (PBS mit 1%

FCS) gewaschen, in 100µl FACS-Puffer aufgenommen und mit den jeweiligen Antikörpern für 30-45min im Kühlschrank inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen wieder in FACS-Puffer aufgenommen und konnten dann im Durchflusszytometer (entweder FACS Calibur, BD, FACS LSRII, BD oder FACS Aria III, BD) analysiert werden. Bei Messungen am LSRII wurden zur späteren Kompensation der Spektralüberlappungen das „BD™ CompBeads Anti-Mouse Ig, κ -Set“ (BD) verwendet. Mit jedem verwendeten Antikörper wurde zusätzlich je eine Probe eines Gemisches aus 20µl positiven und 20µl negativen Beads angefärbt und gemessen. Die aufgezeichneten Daten wurden mithilfe der Flow-Jo-Software (Tree Star) ausgewertet.

2.4.2 Färbung intrazellulärer Proteine

Die erfolgreiche Transfektion und Expression von PRAME-ivt-mRNA in mLCL und DC und der Nachweis von sezerniertem IFN-γ in peptid-spezifischen murinen PBMC wurde mittels intrazellulärer Proteinfärbung überprüft. Hierzu wurden die Reagenzien des „FoxP3-Staining-Kits“ (BD) verwendet. Der 1x Permeabilisierungspuffer (PP) und der Fixierungs-/Permeabilisierungspuffer (FP) wurden nach Herstellerangaben gemischt. Es wurden je Färbeansatz $0,5 \times 10^6$ Zellen 1x mit FACS-Puffer (PBS mit 1%FCS) gewaschen und anschließend wieder in 100µl FACS-Puffer aufgenommen. Durch Zugabe von 2µl Blockierungsantikörper und Inkubation von 15min bei 4°C erfolgte die FcR-Blockierung. Nach Zugabe von 500µl PP wurden die Zellen 1x gewaschen, anschließend in 500µl FP aufgenommen und nach gründlichem Vortexen für 45min bei 4°C inkubiert. Die Ansätze wurden mit 500µl PP aufgefüllt, 1x gewaschen und in 100µl PP resuspendiert. Nach Zugabe von 2µl des primären, PRAME-spezifischen Antikörpers (1:50) oder des direkt markierten IFN-γ-Antikörpers wurden die Zellen wieder für 45min bei 4°C inkubiert. Wiederum wurden die Ansätze mit 500µl PP aufgefüllt, 1x gewaschen und die Zellen in 100µl PP resuspendiert. Im Falle der PRAME-Färbung erfolgte nun die Zugabe des sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörper-spezifischen Antikörpers (1:100) und eine weitere Inkubation für 30 min bei 4°C. Mittels eines letzten Waschschriftes mit 500µl PP wurden nochmal überschüssige Antikörper entfernt und die Zellen anschließend in 100µl FACS-Puffer resuspendiert. Als

Negativkontrollen wurden mit H₂O transfizierte Zellen parallel nach dem gleichen Schema mitgefärbt. Die Zellen konnten anschließend in einem Durchflusszytometer (FACS Calibur, BD oder FACS LSRII, BD) analysiert werden.

2.4.3 Tetramerfärbung

Um MART-1-spezifische T-Zellen zu identifizieren und zu isolieren wurde ein HLA-A*02:01-MART-1(ELA)-Tetramer (PE-konjugiertes HLA-A*02:01-MART-1(ELA)-Tetramer, D. Busch, TU München) verwendet. Dazu wurden je 1×10^6 Milzzellen aus MART-1-immunisierten ABabDII Mäusen nach einmaligem Waschen mit FACS-Puffer in 100 μ l FACS Puffer aufgenommen und mit 2 μ l Tetramer gefärbt. Die Zellen wurden für 25min bei 4°C inkubiert. Zusätzlich wurden die Zellen extrazellulär mit einem CD8-spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörper gefärbt und für weitere 20min bei 4°C inkubiert. Nach insgesamt 45min wurden die Zellen 1x mit FACS-Puffer gewaschen, in 200 μ l FACS-Puffer resuspendiert und direkt im Durchflusszytometer analysiert (FACS-Aria III, BD).

2.4.4 Färbung des T-Zell-Aktivierungsmarkers CD137

Um den Aktivierungsmarker CD137 auf Antigen-spezifischen T-Zellen zu färben, wurden Ansätze zu jeweils 1×10^6 Milzzellen von ABabDII Mäusen mit je 2 μ l des fluoreszenzmarkierten CD137-Antikörpers extrazellulär gefärbt. (siehe Abschnitt 2.4.1). Zusätzlich wurden die Zellen mit einem CD8-spezifischen, direkt markierten Antikörper extrazellulär gefärbt. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte an einem FACS AriaIII von BD.

2.4.5 IFN- γ Capture Assay

Um antigen-spezifische, IFN- γ -sezernierende T-Zellen nachweisen zu können, wurde ein „Mouse IFN- γ Secretion Assay“ mit dem „Cell Enrichment and Detection Kit“ von MACS (Miltenyi Biotech) durchgeführt (Becker et al., 2001). Der verwendete Waschpuffer wurde nach Herstellerangaben gemischt, als

Medium wurde CM-Medium ohne Serum verwendet. Die Milzzellen von ABabDII Mäusen wurden 1x mit Medium gewaschen, aufgenommen, gezählt und auf eine Zellzahl von 1×10^7 Zellen/ml eingestellt. Je 1ml dieser Zellsuspension wurde in eine Vertiefung einer 24-Loch-Flachboden-Platte überführt und mit 10µg spezifischem Peptid für 5h bei 37°C im Brutschrank stimuliert. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen aus je einer Vertiefung der 24-Loch-Platte (10^7 Zellen) in ein 15ml Reaktionsgefäß überführt. Die Röhrchen wurden mit 10ml kaltem Puffer aufgefüllt und für 10min bei 300xg und 4°C zentrifugiert. Die Zellen wurden wieder in 10ml kaltem Puffer resuspendiert und der Waschschrift wurde wiederholt. Die sedimentierten Zellen wurden anschließend in 80µl kaltem Medium resuspendiert und nach Zugabe von 20µl IFN-γ-Catch-Reagent für 5min auf Eis inkubiert. Dann wurden die 15ml Röhrchen mit 10ml warmem (37°) Medium aufgefüllt und bei 37°C für 45min in den Brutschrank gestellt. Dabei wurden die Zellen alle 1-2min vorsichtig gemischt (auf den Kopf gestellt). Nach 45min wurden die Röhrchen wieder auf Eis gestellt, mit 5ml kaltem Puffer aufgefüllt und für 10min bei 300xg und 4°C zentrifugiert. Die Zellen wurden 1x mit 10ml kaltem Puffer gewaschen und nach wiederholter Zentrifugation in 80µl kaltem Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 20µl Detection-Antikörper (PE-konjugiert) und eines CD8-Antikörpers (1:100, APC-eFluor 780) wurden die Zellen für 10min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden nochmals mit 10ml kaltem Puffer je 15ml Röhrchen gewaschen, abzentrifugiert und schließlich in 1-2ml kaltes Medium aufgenommen. Als Negativkontrolle wurde immer auch ein Ansatz unstimulierter Milzzellen parallel mitgefärbt. Die Zellen wurden direkt im Anschluss mit einem FACS-Aria III (BD) analysiert.

2.4.6 Sortierung spezifischer Zellpopulationen

Alle für diese Arbeit durchgeführten Sortierungen wurden an einem FACS Aria III (BD) durchgeführt. Zur Isolierung Antigen-spezifischer T-Zellen aus ABabDII Mäusen wurden die murinen Milzzellen entweder mit einem Tetramer, mit einem CD137-spezifischen Antikörper oder mittels IFN-γ Capture Assay (siehe Abschnitte 2.3.1-2.3.3) gefärbt. Zusätzlich wurde stets auch eine extrazelluläre Färbung mit einem fluoreszenzmarkierten CD8- und CD4-Antikörper durchgeführt. Direkt vor der Sortierung wurden die bereits gefärbten, zu

analysierenden Zellen durch ein Zellsieb gedrückt. Die gewünschte Zellpopulation ($CD8^+$ /Tetramer $^+$ oder $CD8^+$ /IFN- γ^+ oder $CD8^+$ /CD137 $^+$) wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße mit 500 μ l vorgelegtem CM-Medium ohne Serum sortiert. Direkt im Anschluss an die Sortierung erfolgte die RNA-Isolierung.

2.5 Nukleinsäure-Analysen in verschiedenen Zellen

2.5.1 Isolierung zellulärer Gesamt-RNA

Zur Isolierung zellulärer Gesamt-RNA wurden die Zellen durch Zentrifugation in 1,5ml Reaktionsgefäßen sedimentiert und in TriReagent $^{\text{®}}$ aufgenommen (1×10^6 Zellen in 200 μ l TriReagent $^{\text{®}}$) und durch Vortexen homogenisiert. Wenn an dieser Stelle nicht direkt die RNA-Isolierung durchgeführt werden konnte, so konnten die in TriReagent $^{\text{®}}$ aufgenommenen Proben auch für mehrere Tage bei -20°C gelagert werden. Schloß sich die RNA-Isolierung jedoch direkt an, so wurde nach 5-10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und Zugabe von 15 μ l Acrylamid das Homogenat mit 40 μ l 1-Brom-3-Chlorpropan versetzt und durch Vortexen für 15 Sekunden gründlich gemischt. Nach einer Inkubation von 10min bei Raumtemperatur wurden die Proben für 15min bei 12000xg und 4°C zentrifugiert. Die dadurch entstandene obere, wässrige und RNA-haltige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in vorgekühlte 1,5ml Reaktionsgefäße überführt. Nach Zugabe von Isopropanol im Verhältnis 1:1 und gründlichem Vortexen wurden die Proben für 10min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 12min bei 12000xg und 4°C wurde der Überstand vollständig entfernt. Das entstandene RNA-Pellet wurde durch Zugabe von 500 μ l Ethanol (75%) vom Boden des Reaktionsgefäßes abgelöst und 1x gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation von 8min bei 12000xg und 4°C wurde der Überstand wieder restlos abgenommen und das Pellet für 3-5min bei offenem Reaktionsgefäß stehen gelassen. Nach Resuspension der RNA in 20 μ l Nuklease-freiem H $_2$ O und einer Inkubation von 10min bei 55°C in einem Heizblock wurde mithilfe eines UV/Vis-Spectralphotometers (NanoDrop ND-1000, PEQLAB) der RNA-Gehalt bestimmt. Zur längerfristigeren Lagerung wurden die Proben bei

-20°C aufbewahrt.

2.5.2 Reverse Transkription von mRNA in cDNA

Zur Synthese einzelsträngiger cDNA-Sequenzen aus zuvor isolierter zellulärer Gesamt-RNA für die Verwendung in einer qPCR (quantitative PCR) wurde das „1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)“ von Roche eingesetzt. Die cDNA-Synthese wurde entweder direkt im Anschluss an die Isolierung zellulärer Gesamt-RNA durchgeführt oder es wurden bei -20°C aufbewahrte Proben verwendet. In diesem Fall mussten die langsam auf Eis aufgetauten Proben nochmals für 10 min bei 55°C in einem Heizblock inkubiert werden, um mögliche Sekundärstrukturen zu lösen. Im Anschluss daran wurde die RNA mit den verschiedenen im Kit enthaltenen Reagenzien entsprechend der Angaben des Herstellers in einem 0,5ml Reaktionsgefäß angesetzt. In einem PCR-Thermocycler (T1, Biometra) wurden die Proben dann nach Herstellerangaben inkubiert (10min 25°C, 60min 42°C, 5min 99°C und einer anschließenden Abkühlphase auf 4°C). Zur langfristigen Lagerung wurden die Proben bei -20°C verwahrt.

2.5.3 Antigen-Expressionsanalysen mittels qRT-PCR

Um verschiedene Zelltypen auf die Expression der Prostatakrebs-assoziierten Antigene (CaP-Antigene) PRAME, PSA, PSMA, PCTA und STEAP zu untersuchen, wurde zelluläre Gesamt-RNA unterschiedlicher Zelllinien und PBL-Subpopulationen isoliert (siehe 2.5.1) und in cDNA umgeschrieben (siehe 2.5.4). Die Proben sollten dann mittels qRT-PCR auf das Vorhandensein Antigenkodierender DNA untersucht werden, wozu die Reagenzien des „LightCyclerR 480 SYBR Green I Master-Kits“ (Roche) verwendet wurden. Als interne Kontrolle wurden die Proben parallel zur Untersuchung auf Gehalt an Antigen-DNA, mittels spezifischer Primer auch auf den Gehalt von 18S-rRNA hin überprüft. Als Negativkontrolle für alle verwendeten Primer wurde in ansonsten identischen PCR Ansätze anstatt der Matritzen-DNA H₂O eingesetzt. Die Reaktionen wurden in 0,5ml Reaktionsgefäßen auf Eis nach Angaben des Herstellers angesetzt und nach Zugaben des Enzyms in 20µl Glaskapillaren

(Roche) überführt.

Tabelle II-24 Reaktionsansatz qRT-PCR

Reagenz	Menge
H ₂ O	10µl
5' Primer (10pmol)	2µl
3' Primer (10pmol)	2µl
SYBR Green/Enzym Mix	4µl
cDNA/H ₂ O	2µl

Tabelle II-25 Reaktionsbedingungen der qRT-PCR

Phase	Temp.	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95°C	10min	1
Denaturierung	95°C	1sek	33
Primer-Anlagerung	60°C	10sek	
Elongation	72°C	25sek	
Schmelzkurve	95°C 65°C	5sek 1min	1
Kühlung	4°C	∞	

Direkt im Anschluss an die PCR-Reaktion wurden die Proben aus den Glaskapillaren zentrifugiert und auf einem Agarosegel (1%) gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe Abschnitt 2.2.2). Mithilfe eines UV-Transilluminators wurden die Banden analysiert und dokumentiert. Die Banden wurden aus dem Gel extrahiert (siehe Abschnitt 2.2.3) und zur Sequenzanalyse eingeschickt (siehe Abschnitt 2.3.4).

2.5.4 RACE-PCR zur Analyse von TCRα- und TCRβ-Sequenzen

Um die TCR-Sequenzen aus den mittels Sortierung angereicherten Antigen-spezifischen T-Zellen zu identifizieren wurde das Verfahren der RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends-PCR) verwendet (Zhu et al., 2001; Chenchik

et al., 1998). Dieses Verfahren bietet den Vorteil, dass nur ein genspezifischer Primer (anstelle von zwei Primern) benötigt wird, und somit auch weitgehend unbekannte DNA-Abschnitte amplifiziert werden können. Für diese Arbeit wurde stets eine 5'RACE-PCR durchgeführt, alle verwendeten Reagenzien entstammten dem „SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit“ (Clontech) und dem „Advantage® 2 PCR Kit“ (Clontech). Als Polymerase wurde eine Titanium® *Taq* DNA Polymerase verwendet.

Die aus den sortierten, Antigen-spezifischen T-Zellen isolierte zelluläre Gesamt-RNA (siehe Abschnitt 2.5.1) wurde für die Synthese der „RACE-ready“-cDNA verwendet. Hierzu wurde der 5'CDS-Primer (ein Oligo (dT) Primer) verwendet, welcher an den Poly-A-Schwanz am 3'Ende der RNA bindet. Die DNA-Synthese des ersten Stranges erfolgt in 3`Richtung durch die SMARTScribe Reverse Transkriptase (eine Variante der MMLV RT). Wird das Ende der RNA-Vorlage erreicht, hängt das Enzym (RT) mehrere Nucleotide an das 3'Ende des gerade synthetisierten cDNA-Stranges an. Nach Zugabe des SMARTer II A Oligonukleotids, welches sich an die von der RT angehängte Nukleotidsequenz anlagert, kann das Enzym dieses Oligonukleotid als Startpunkt für die Gegenstrang-Synthese verwenden.

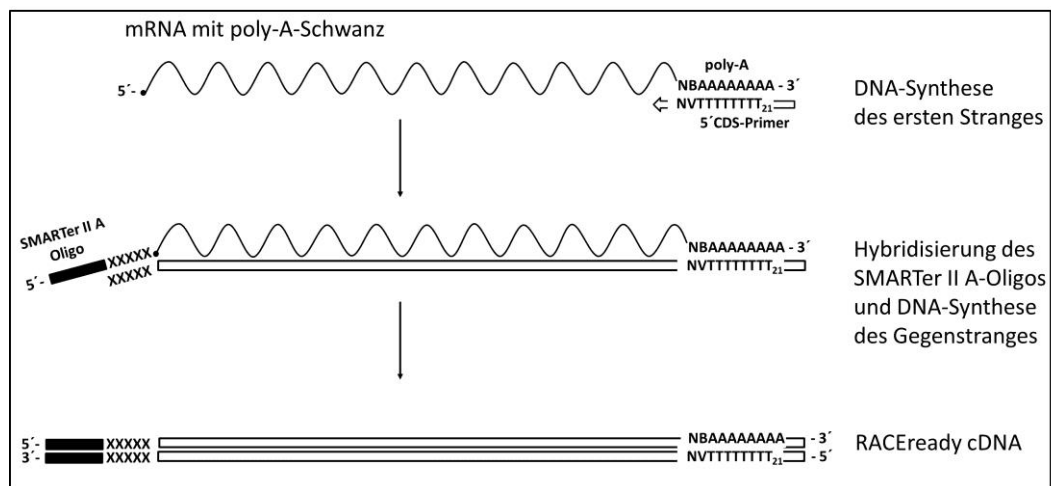


Abbildung I-2: Prinzip der Synthese der RACEready cDNA (adaptiert nach Clontech, SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit User Manual)

Der 5'CDS (Oligo (dT)) -Primer hybridisiert an den Poly-A-Schwanz der mRNA und ermöglicht dadurch die Synthese des ersten DNA-Stranges durch die RT. Das Enzym hängt am 3'Ende des ersten Stranges eine spezifische Folge von Nukleotiden an, an welche das SMARTer II A Oligonukleotid bindet und somit die DNA-Synthese des Gegenstranges durch die RT ermöglicht.

Die auf diese Weise synthetisierte cDNA wurde dann für die PCR-Reaktion eingesetzt. Da das Ziel die Amplifikation der für die TCR α - und TCR β -Ketten kodierende cDNA war, und die Sequenz dieser Ketten nicht bekannt war, wurde der genspezifische Primer so gewählt, dass er in der konstanten Region der TCR-Ketten binden würde. Während es eine große Variation möglicher variabler TCR α - und TCR β -Ketten (V α bzw. V β) gibt, haben alle TCR α -Ketten die gleiche konstante Region (C α). Alle TCR β -Ketten besitzen eine von 2 möglichen C-Regionen (C β 1 oder C β 2), wobei diese sehr ähnlich zueinander sind, so dass der genspezifische Primer für die c-Region der TCR β -Kette so gewählt wurde, dass er sowohl an C β 1 als auch an C β 2 binden konnte. Als genspezifische 5'Primer wurden also Oligonukleotide gewählt, die in der C-Region der TCR-Ketten binden sollten, um die Amplifikation der zum 3'Ende unbekannten TCR-Sequenzen zu ermöglichen. Die Primer (5'TRAC: 5'-CGGCCACTTTCAGGAG GAGGATTCGGAAC und 5'TRBC: 5'-CCGTAGAACTGGACTTGACAGCGG AAGTGG) wurden von I. Gavvovidis (MCD, Berlin) ausgewählt und zur Verfügung gestellt. Für jede Probe wurden also zwei Ansätze, einmal mit dem TRAC- und einmal mit dem TRBC-Primer, angesetzt. Um ein qualitativ möglichst gutes PCR-Produkt zu erhalten, wurden in einem zweiten Lauf sogenannte „nested“-Primer eingesetzt (nested-TRAC: 5'-CCACAGCACTGTTG CTCTTGAAGTC und nested-TRBC: 5'- GCTCAGGCAGTATCTGGAGTCA TTGA). Für die Synthese der „RACeready“-cDNA wurden 5 μ l der isolierten zellulären Gesamt-RNA eingesetzt (sehr geringer RNA-Gehalt), und für den ersten PCR-Lauf wurden 4 μ l cDNA eingesetzt, ansonsten wurden alle Reagenzien nach Angaben des Herstellers verwendet.

Tabelle II-26 Reaktionsansatz cDNA-Synthese

	Reagenz	Menge
Buffer-Mix:	5x First-Strand Buffer	2 μ l
	DTT	1 μ l
	dNTP	1 μ l
Master-Mix:	Buffer-Mix	4 μ l
	RNAse Inhibitor	0,25 μ l
	RT SMARTScribe	1 μ l
DNA-Synthese:	Master-Mix	5,25 μ l
	Denaturierte RNA (inkl. 5'CDS und Oligo)	7 μ l

Tabelle II-27 Reaktionsansatz 5'RACE-PCR

	Reagenz	Menge
Master-Mix:	H ₂ O	34,5µl
	Polymerase-Puffer (10x)	5µl
	dNTP	1µl
	Polymerase	1µl
PCR-Ansatz:	cDNA	4µl
	UPM (universal Primer-Mix)	5µl
	Genspezifischer Primer	1µl
	Master-Mix	41,5µl

Tabelle II-28 Reaktionsansatz 5'nested-RACE-PCR

	Reagenz	Menge
Master-Mix:	H ₂ O	34,5µl
	Polymerase-Puffer (10x)	5µl
	dNTP	1µl
	Polymerase	1µl
PCR-Ansatz:	RACE-PCR-Produkt (verdünnt)	5µl
	nested UPM	1µl
	nested-genspez. Primer	1µl
	Master-Mix	41,5µl

Tabelle II-29 Ablauf cDNA-Synthese mit Reaktionsbedingungen

	Reagenz	Menge
Ansatz:	zelluläre Gesamt-RNA	5µl
	5'CDS-Primer	1µl
Denaturierung:	72°C 3min	
	42°C 2min	
Ansatz:	denaturierte RNA (inkl 5'CDS)	6µl
	SMARTer IIA Oligo	1µl
+	Master-Mix	5,25µl
cDNA-Synthese: 42°C 90min		
Ansatz:	cDNA	12,25µl (alles)
	Tricine-EDTA Puffer	17µl

Tabelle II-30 Ablauf 5' RACE-PCR mit Reaktionsbedingungen

	Temperatur	Dauer	Zyklen
Ansatz siehe Tab. II-27	94°C	30sek	5x
	<u>72°C</u>	<u>3min</u>	
	94°C	30sek	5x
	70°C	30sek	
	<u>72°C</u>	<u>3min</u>	
	94°C	30sek	40x
	68°C	30sek	
	<u>72°C</u>	<u>3min</u>	
	<u>72°C</u>	<u>3min</u>	1x
	<u>4°C</u>	<u>∞</u>	
Ansatz:	RACE-PCR-Produkt	5µl	
	Tricine-EDTA-Puffer	150µl	

Tabelle II-31 Ablauf 5' nested-RACE-PCR

	Temperatur	Dauer	Zyklen
Ansatz siehe Tab. II-28	94°C	30sek	30x
	68°C	30sek	
	<u>72°C</u>	<u>3min</u>	
	<u>72°C</u>	<u>3min</u>	1x
	4°C	∞	

Als Postivkontrolle wurde jedesmal eine Probe zellulärer Gesamt-RNA eines T-Zell-Klones mit bekannter TCR α/β -Sequenz parallel amplifiziert.

Die DNA-Produkte der 5' nested-RACE-PCR wurden direkt im Anschluss an die PCR auf ein Agarosegel (1%) aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe Abschnitt 2.2.2) Mit einem UV-Transilluminator wurden die DNA-Banden sichtbar gemacht, dokumentiert, mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und extrahiert (siehe Abschnitt 2.2.3).

2.5.5 Sequenzanalyse der RACE-PCR-Produkte

Es musste davon ausgegangen werden, dass in den sortierten, Antigen-spezifischen T-Zellen (deren TCR-Sequenzen mithilfe der RACE-PCR amplifiziert wurden) keine monoklonale T-Zell-Population vorlag, sondern T-Zellen mit verschiedenen TCR-Sequenzen enthalten waren. Daher konnten die RACE-PCR-Produkte nicht einfach zur Sequenzierung eingeschickt werden. Um nun die einzelnen, im PCR-Produkt enthaltenen TCR-Sequenzen voneinander isolieren und identifizieren zu können, wurden die PCR-Produkte durch „blunt-end“-Ligation in einen Vektor eingebracht. Dabei wird jeweils immer nur eine DNA-Sequenz (und somit eine TCR-Sequenz) in den Vektor ligiert, wodurch eine Trennung der einzelnen Sequenzen aus dem Gemisch verschiedener Sequenzen im PCR-Produkt möglich wurde. Als Vektor für die blunt-end-Ligation wurde der im „Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit for Sequencing“ (Invitrogen) enthaltene „pCR™ 4Blunt-TOPO®“-Vektor verwendet (Bernard et al., 1992; Bernard et al., 1994). Dieser im Kit enthaltene Vektor liegt linearisiert vor und die Vaccinia-Virus DNA-Topoisomerase I ist kovalent an die freien 3'Enden des doppelsträngigen DNA-Vektors gebunden. Für die Linearisierung des Vektors ist die Topoisomerase verantwortlich (Shuman et al., 1991). Die durch das Aufbrechen des Phosphodiester-Rückgrats der DNA-Stränge frei werdende Energie konserviert sie in einer kovalenten Bindung zwischen dem 3'Phosphat des geschnittenen Stranges und einem internen Tyrosyl-Rest (Tyr-274). Durch die freien 5'Hydroxylgruppen der doppelsträngigen PCR-Produkte kann diese energiereiche Phospho-Tyrosyl-Bindung attackiert und rückgängig gemacht werden. Dabei wird die Topoisomerase frei und das PCR-Produkt blunt-end in den Vektor eingesetzt.

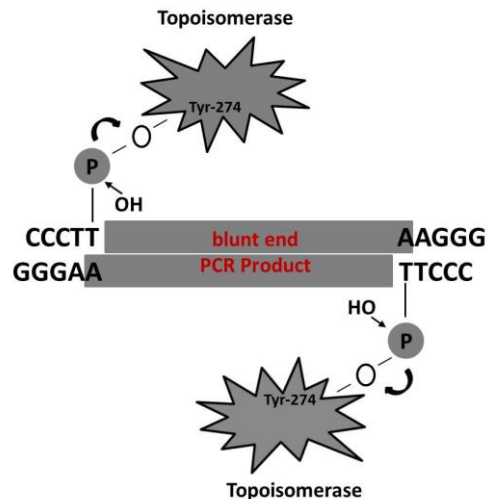


Abbildung II-3: Klonierung der blunt-end PCR-Produkte in den pCR™ 4Blunt-TOPO®-Vektor (adaptiert nach Invitrogen, Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit for Sequencing User Manual)

Die Vaccinia virus I Topoisomerase bindet 5' der CCCTT-Sequenz. Die durch den Bruch der Phosphodiester-Bindung frei gewordene Energie wird in einer kovalenten Bindung zwischen dem 3'-Phosphat des geschnittenen Stranges und einem Tyrosyl-Rest (Tyr-274) konserviert. Die freien 5'-Hydroxylgruppen des blunt-end PCR-Produktes attackieren diese Bindung, wodurch die Topoisomerase I freigesetzt wird und das PCR-Produkt blunt-end in den DNA-Doppelstrang des Vektors ligiert wird.

Für die Ligation der PCR-Produkte in den TOPO®-Vektor wurden alle Reagenzien nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

Tabelle II-32 Ansatz der TOPO®-Klonierungs-Reaktion

Reagenz	Menge
Frisches PCR-Produkt	4µl
Salz-Lösung	1µl
TOPO®-Vektor	1µl

Nach vorsichtigem Mischen wurden die Ansätze für 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Direkt im Anschluss wurden die frischen Ligationsprodukte zur Transformation chemisch kompetenter „One Shot® Mach1™-T1® chemically Competent E.coli“ verwendet (siehe Abschnitt 2.2.9).

Die nach dem Ausplattieren gewachsenen Einzelkolonien (welche nun jeweils Plasmide mit einer einzigen TCR-Sequenz enthielten) wurden selektiert,

expandiert und die enthaltene Plasmid-DNA wurde isoliert (siehe Abschnitte 2.2.11 und 2.2.12) und zur Sequenzanalyse an die Firma MWG (Ebersberg) geschickt.

2.6 *In-vivo* Versuche

2.6.1 ABabDII Mausmodell

Der Tierversuch, der die Grundlage dieser Doktorarbeit darstellt, wurde am Institut für Molekulare Medizin des Max-Delbrück-Zentrums in Berlin-Buch unter der Leitung von Dr. Ioannis Gavvovidis (Arbeitsgruppe Prof. Thomas Blankenstein) durchgeführt. Die verwendeten Tiere waren ABabDII Mäuse, welche alle aus der hauseigenen Zucht stammten.

Bei ABabDII Mäusen (Li et al., 2010) handelt es sich um Mäuse, welche transgen für den kompletten humanen TCR α - und TCR β -Genlocus sind, jedoch defizient für alle murinen TCR α - und TCR β -Genloci. Diese Mäuse sind zusätzlich transgen für humanes HLA-A2 und humanes β 2-Mikroglobulin und defizient für murine MHC-II-Moleküle. Die Generierung dieser Mäuse erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Blankenstein und basiert auf der Konstruktion von YACs (Yeast artificial chromosomes), welche auf überlappenden DNA-Fragmenten entweder den gesamten humanen TCR α -Genlocus (yHuTRA) oder den kompletten humanen TCR β -Genlocus (yHuTRB) enthielten (Li et al., 2013). Mit Ausnahme einer Deletion von V β 5.1 und V β 6.1, wurden yHuTRA und yHuTRB positiv auf alle humanen V, (D), J und C Gensegmente getestet. Diese YACs wurden mit murinen embryonalen Stammzellen fusioniert und aufgrund einer in den YACs enthaltenen Neomycin-Resistenzkassette konnten erfolgreich fusionierte Stammzellen selektiert werden. Um nun chimäre Mäuse zu generieren, wurden die Stammzellen (die entweder yHuTRA oder yHuTRB enthielten) in Blastozysten injiziert. Die Nachkommen dieser chimären Mäuse waren transgen, entweder für alle humanen TCR α - (hTRA-Tg) oder TCR β -Gensegmente (hTRB-Tg). Die hTRA-Tg- und hTRB-Tg-Mäuse wurden nun mit Mäusen gekreuzt, die

defizient für die murinen TCR α / β -Gensegmente (*Tcra*^{-/-} bzw. *Tcrb*^{-/-}) waren. Die daraus entstandenen Nachkommen (hTRA-Tg *Tcra*^{-/-} und hTRB-Tg *Tcrb*^{-/-}) wurden nun miteinander verpaart um Tiere zu generieren, welche sowohl für die humanen α - als auch für die β -Genloci transgen sein sollten (hTRA-Tg, hTRB-Tg, *Tcra*^{-/-}, *Tcrb*^{-/-}, genannt ABab). Diese ABab-Mäuse wurden nun mit HHDII-Mäusen gekreuzt. HHDII Mäuse tragen humanes HLA-A*02:01 als ein Transgen, fusioniert an humanes β_2 -Mikroglobulin (B2M), gleichzeitig sind sie defizient für die murinen B2m- und H2-D^b-Gene. Mäuse die aus dieser Kreuzung hervorgehen, werden ABabDII Mäuse genannt. Die Züchtung und Charakterisierung dieses Mausstammes nahm über 7 Jahre in Anspruch.

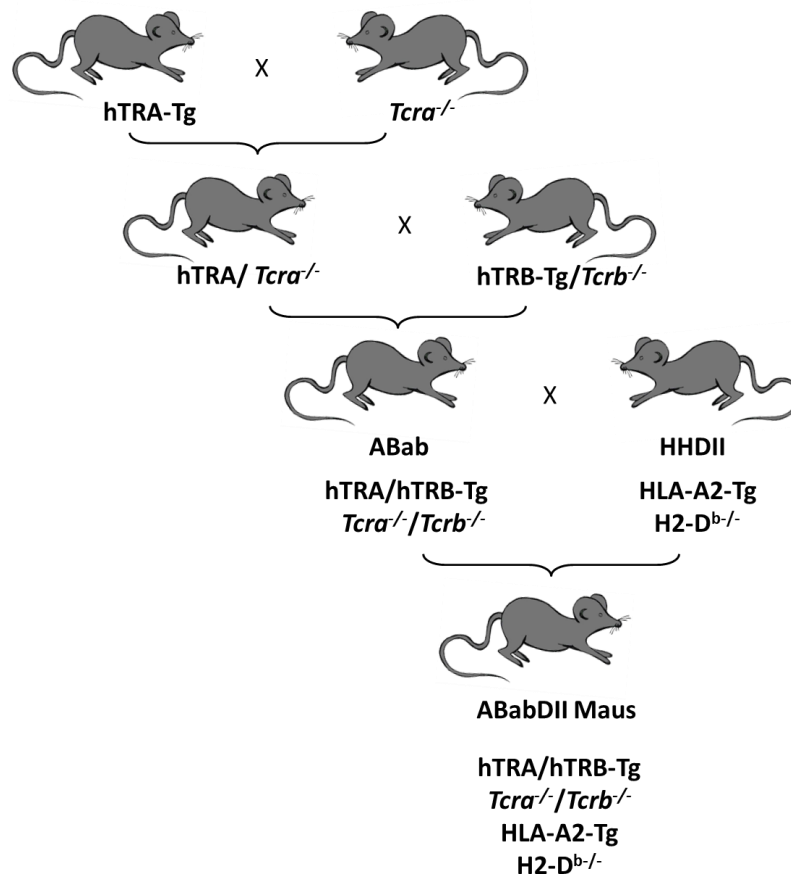


Abbildung II-4: Kreuzungsschema des ABabDII Mausmodells

2.6.2 Immunisierung von ABabDII-Mäusen

Der für diese Arbeit durchgeführte Tierversuch war unter der Tierversuchsnummer TVV322/10 bei der zuständigen Veterinärbehörde (Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin) gemeldet.

Insgesamt wurden für diese Arbeit 49 Tiere (sowohl weibliche, als auch männliche Tiere) in 6 Gruppen mit verschiedenen Peptiden immunisiert. Die Immunisierungen erfolgten intradermal.

Tabelle II-33 Immunisierung der ABabDII-Mäuse

Peptid	Anzahl Tiere		Agens	Menge
MART-1	3	} jedes Tier immunisiert mit:	Peptid	100µg
PCTA	9		CpG1826	50 µg
PRAME	11		PBS	ad 100 µl
PSA	6		IFA	100 µl
PSCA	8			
PSMA	9			
STEAP	5			

3 Wochen nach der ersten Injektion erfolgte der erste Boost, weitere 4 Wochen später der 2. Boost. Jeweils 7 Tage nach einer Immunisierung wurde den Tieren Blut aus der Schwanzvene abgenommen, um nach in-vitro Stimulation mit dem entsprechenden Peptid und intrazellulärer IFN- γ -Färbung das Vorhandensein bzw. die Frequenz Peptid-spezifischer T-Zellen zu bestimmen. Konnten spezifische T-Zellen nachgewiesen werden, so wurden die Tiere getötet (auch jeweils 7 Tage nach der letzten Immunisierung), die Milzen wurden entnommen und mittels Herzpunktion wurde das Blut entnommen. Konnten dagegen keine spezifischen T-Zellen nachgewiesen werden, so wurden die Tiere in größeren Abständen (2-3 Monate) immunisiert, bis eine Induktion der gewünschten Zellen nachweisbar war. Die Abbruchkriterien für diesen Tierversuch waren im Tierversuchsantrag festgelegt. Die Tiere wurden täglich begutachtet.

Im Anschluss an die Organentnahme war eine unmittelbare Inkulturnahme der Milzzellen nötig. Da der Tierversuch in Berlin stattfand, die Isolierung der Zellen und die anschließenden Analysen jedoch in München durchgeführt wurden, mussten die Tiere am 6.Tag nach dem jeweils letzten Boost von Berlin nach München gebracht werden. Der Versand der Tiere erfolgte durch die MDC-interne Tierlogistik, gemäß der Vorschriften für den Versand lebender Tiere.

2.6.3 Organentnahme und Inkulturnahme der isolierten Zellen

Unmittelbar nach Ankunft in München wurden die Tiere mittels CO₂ getötet. Durch die konzentrierte Zufuhr von CO₂ kam es zu akutem Sauerstoffmangel, die Tiere verstarben innerhalb von 20-30 Sekunden. Unmittelbar danach wurde den Tieren durch Herzpunktion mit einer heparinisierten Spritze das gesamte vorhandene periphere Blut entnommen. Nach Eröffnung des Abdomens wurden die Bauchorgane adspektorisch begutachtet und die Milzen isoliert. Die Milzen wurden durch ein Zellsieb (100µm) homogenisiert und in 5ml CM-Medium aufgenommen.

Das Blut und die aus den Maus-Milzen isolierten Zellen wurden direkt nach der Isolierung einer Erythrozyten-Lyse mit ACK-(Ammonium-Chlorid-Potassium) Erythrozyten-Lyse-Puffer unterzogen. Dazu wurde der 10x ACK-Puffer 1:10 mit sterilem H₂O verdünnt (1x Puffer) und 5ml des 1x ACK Puffers wurde auf die Zellen gegeben. Nach maximal 2 min wurde die Erythrozytenlyse mit 20ml PBS abgestoppt, die Milzzellen/Blutzellen wurden abzentrifugiert und in 10ml PBS resuspendiert. Nach wiederholtem Abzentrifugieren wurden die Milzzellen in CM-Medium resuspendiert, durch einen Zell-Sieb (100µm) gedrückt, gezählt und auf eine Konzentration von 12×10^6 /ml eingestellt. 3ml dieser Zellsuspension wurden in eine Kavität einer 6-Loch-Flachboden-Zellkulturplatte überführt und bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Aus den Milzzellen wurden am nächsten Tag entweder mittels Tetramer-Färbung, Färbung des Aktivierungsmarkers CD137 oder IFN-γ Capture Assay die Peptid-spezifischen T-Zellen identifiziert und mittels Sortierung angereichert.

Die Blutzellen wurden nach der Erythrozyten-Lyse ebenfalls in CM-Medium aufgenommen und dann für eine intrazelluläre Färbung mit einem direkt-fluoreszenzmarkierten IFN-γ-Antikörper verwendet (siehe Abschnitt 2.4.2). Um die IFN-γ-Freisetzung in den Peptid-spezifischen T-Zellen zu initiieren, wurden die Blutzellen (1×10^6 in einer Kavität einer 96-Loch-Rundboden-Zellkulturplatte) mit dem jeweiligen Peptid (10^{-5} M) über Nacht stimuliert. Durch Zugabe von Brefeldin A (5µg auf 200µl/Kavität) wurde der retrograde Transport des IFN-γ vom Golgi-Apparat zum ER (endoplasmatisches Retikulum) induziert, was zur Anreicherung des Zytokins im ER führte und somit eine intrazelluläre Färbung des IFN-γ ermöglichte.

III ERGEBNISSE

1. Verschiedene Methoden zur Isolierung spezifischer T-Zellen im Vergleich: MART-1-immunisierte ABabDII-Mäuse als Modellsystem

1.1 Möglichkeiten zur Isolierung Peptid-spezifischer T-Zellen aus ABabDII-Mäusen

Zu Beginn dieser Arbeit stellte sich die Frage, wie eine erfolgreiche Identifikation und Isolierung von *in-vivo* induzierten Antigen-spezifischen T-Zellen aus den immunisierten Mäusen am Besten zu bewerkstelligen wäre.

Wie von Li LP et al. (2010) beschrieben, sind HLA-A2-Peptid-Tetramere ein sehr effizientes Werkzeug, um Peptid-spezifische T-Zellen zu isolieren. Tetramere sind Peptid:MHC-Komplexe, bestehend aus 4 gleichen Peptiden, die an 4 ebenfalls identische MHC-Klasse-I-Moleküle und β_2 -Mikroglobulin gebunden sind (Altman JD et al., 1996). T-Zell Rezeptoren, welche für das im Tetramer gebundene Peptid spezifisch sind, können (bei übereinstimmender MHC-Restriktion) an diese Tetramer-Komplexe binden. Durch Konjugation der Tetramer-Komplexe an ein fluoreszierendes Molekül (z.B. PE) können die spezifisch gebundenen T-Zellen im FACS analysiert und sortiert werden.

Da Tetramere jedoch nicht nur mit dem TCR (welcher bei ABabDII Mäusen ein humaner TCR ist) interagieren, sondern auch mit dem CD8-Co-Rezeptor (welches bei ABabDII T-Zellen ein murines Molekül ist), lässt sich im Voraus keine Aussage darüber machen, ob ein humanes Tetramer von Peptid-spezifischen ABabDII-T-Zellen auch wirklich erkannt wird. Das stellt natürlich ein gewisses Risiko dar, zumal Tetramere zum einen in der Herstellung sehr kostspielig sind, zum anderen wird für die Färbung der gesamten Milzzellen einer Maus eine große Menge des Tetramers benötigt (etwa 2 μ l Tetramer für 1x10⁶Zellen). Daher war es wichtig, eine Alternative zur Isolierung von Antigen-spezifischen T-Zellen zu etablieren.

Eine solche Alternative stellt z. B. die Färbung von Aktivierungsmarkern auf den

T-Zellen dar. Der Aktivierungsmarker CD137 (4-1BB) ist ein Mitglied der TNFR-Familie und wird nach Aktivierung des TCR-CDR3-Komplexes in T-Zellen exprimiert (Alderson et al., 1994). Kinetische Untersuchungen (Taraban et al., 2002) haben gezeigt, dass bei murinen CD8⁺ T-Zellen diese CD137-Hochregulation 24h nach TCR-Ligation beginnt und ihr Maximum nach 48h erreicht. Durch Peptid-Stimulation kann also die CD137-Expression auf Peptid-spezifischen T-Zellen induziert werden, und 48h später können diese Zellen nach Färbung mit einem CD137-spezifischen Antikörper im FACS analysiert werden. Eine dritte Möglichkeit zur Identifizierung Peptid-spezifischer T-Zellen stellt der Nachweis des IFN- γ dar, welches nach Aktivierung von den T-Zellen sezerniert wird. Die intrazelluläre Färbung dieses Zytokins ist daher ein gängiges Verfahren, um spezifische T-Zellen nachzuweisen (Picker et al., 1995; Crucian et al., 1996). Nach Peptidstimulation und Zugabe von BFA (siehe Kapitel II, Abschnitt 2.4.4) wird in den spezifischen T-Zellen die Synthese und intrazelluläre Akkumulation des IFN- γ induziert, wodurch das Zytokin mittels eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers nachweisbar ist. Bei intrazellulären Färbungen ist gewöhnlich eine Fixierung der Zellen nötig, wodurch deren Zellmembran permeabilisiert wird und eine RNA-Isolierung nach der Sortierung nicht mehr möglich ist. Jedoch haben Becker et al. (2001) mit der Entwicklung eines sogenannten „IFN- γ -Capture-Assays“ (siehe Kapitel II, Abschnitt 2.4.5) eine Methode geschaffen, mit der die Zytokinsekretion an lebenden Zellen nachgewiesen werden kann, was zudem die Sortierung und RNA-Isolierung dieser Zellen ermöglicht.

Um nun herauszufinden, welche dieser drei Methoden sich zur Isolierung der *in-vivo* induzierten, Peptid-spezifischen T-Zellen am Besten eignet, wurden drei ABabDII-Mäuse mit dem MART-1 ELA₂₆₋₃₅-Peptid (ELAGIGILT) immunisiert. Für dieses Peptid konnten Li LP et al., (2010) bereits erfolgreiche Immunisierungen bei ABabDII-Mäusen durchführen und zeigen, dass auch eine Isolierung der induzierten T-Zellen mit dem humanen MHC-Klasse-I-ELA₂₆₋₃₅-Tetramer möglich ist. Daher waren ELA-immunisierte ABabDII-Mäuse das perfekte Modellsystem, um die T-Zell-Isolierung mittels Tetrameren mit denjenigen Anreicherungsverfahren zu vergleichen, die auf der CD137-Expression oder des IFN- γ -Capture-Assays basierten.

1.1.1 *In-vivo* Induktion und Isolierung MART-1-spezifischer T-Zellen aus ABabDII-Mäusen

Drei ABabDII-Mäuse wurden mit dem ELA₂₆₋₃₅-Peptid (ELAGIGILTV) immunisiert (siehe Kapitel II, Abschnitt 2.6.2). Nach 4 Wochen wurden die Tiere geboostet und 7 Tage später wurde jeder Maus Blut entnommen und nach Tetramer-Färbung im FACS auf das Vorhandensein ELA-spezifischer T-Zellen überprüft (siehe Abb. III-1) Bei allen 3 Mäusen konnten ELA-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden.

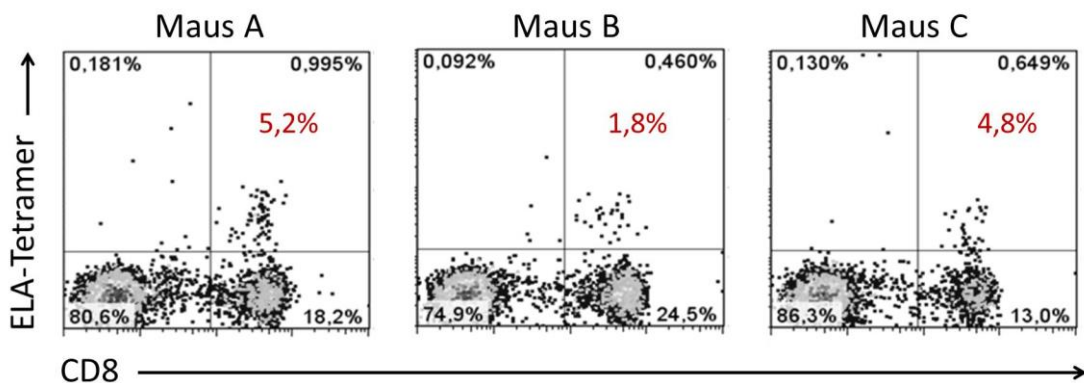


Abbildung III-1: Tetramerfärbung der murinen PBMC nach dem 1. Boost

Dargestellt sind der Anteil an CD8⁺ und Tetramer⁺ T-Zellen im Blut nach extrazellulärer Färbung mit einem CD8-Antikörper und dem HLA-A*02:01-MART-1-(ELA)-Tetramer (ELAGIGILTV; PE-konjugiert). Die Peptidspezifischen CD8⁺ T-Zellen sind im rechten oberen Quadranten dargestellt, in rot ist der Prozentsatz peptid-spezifischer T-Zellen, anteilig an den Gesamt-CD8⁺ T-Zellen angegeben.

7 Tage nach dem 2. Boost wurden die Tiere getötet, die Milzen entnommen und homogenisiert. Nach der Erythrozyten-Lyse wurden die Milzzellen resuspendiert und in Kultur genommen.

Die Milzzellen von Maus A wurden über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Hälfte der Milzzellen nach 5-stündiger Peptidstimulation mittels IFN- γ -Capture-Assay angefärbt, die andere Hälfte wurde mit dem ELA-Tetramer gefärbt. Von Maus B wurden die kompletten Milzzellen nach 5-stündiger Peptidstimulation mittels IFN- γ -Capture-Reagenzien gefärbt, die Milzzellen von

Maus C wurden 48h nach Peptidstimulation mit einem CD137-spezifischen Antikörper gefärbt. Zusätzlich wurde jeweils auch ein CD8-spezifischer Antikörper verwendet. Die Zellen wurden mit einem FACS Aria III analysiert. Bei allen drei Mäusen konnten spezifische T-Zellen nachgewiesen werden (Abb. III-2). Die CD8⁺ T-Zellen, die sich bei der FACS-Analyse zusätzlich entweder IFN- γ ⁺ (Maus A und B) oder Tetramer-positiv (Maus A) oder CD137⁺ (Maus C) darstellten (Abb. III-2, jeweils im grauen Gate), wurden sortiert und angereichert.

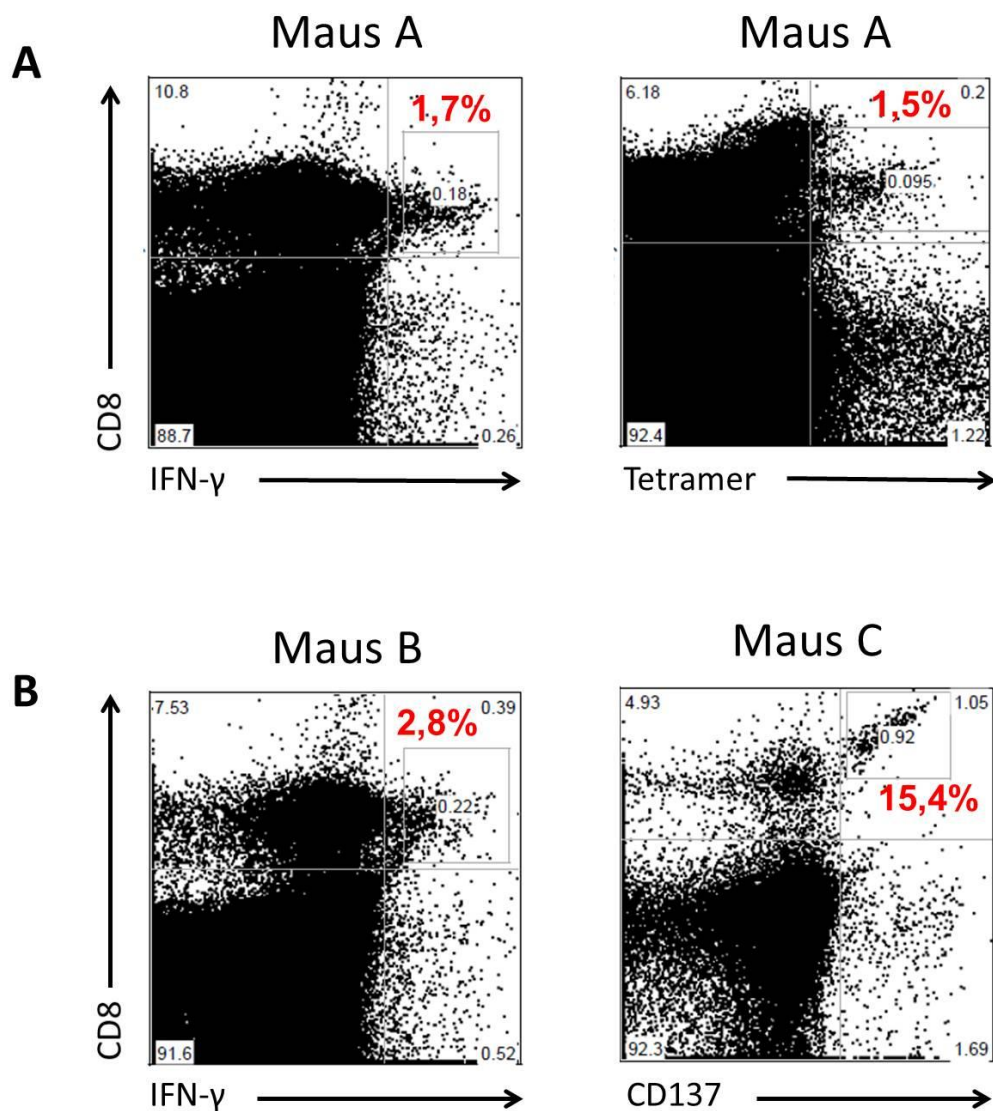


Abbildung III-2: Nachweis und Sortierung Peptid-spezifischer T-Zellen

Dargestellt ist die FACS-Analyse zum Nachweis ELA-spezifischer T-Zellen mit 3 unterschiedlichen Methoden. **A** Bei Maus A wurde die Hälfte der Milzzellen 5h nach Peptidstimulation mittels IFN- γ -Capture-Reagenzien angefärbt; daher sind die IFN- γ^+ /CD8 $^+$ T-Zellen dargestellt, die andere Hälfte der Milzzellen wurde mit dem ELA-Tetramer (ELAGIGILTV) angefärbt; gezeigt sind die CD8 $^+$ /Tetramer $^+$ T-Zellen. **B** Bei Maus B sind die CD8 $^+$, IFN- γ -sezernierenden T-Zellen 5h nach Peptidstimulation dargestellt. Bei Maus C sind die CD8 $^+$ /CD137 $^+$ T-Zellen gezeigt, 48h nach Peptidstimulation. Die roten Zahlen geben den jeweils prozentualen Anteil spezifischer (CD137 $^+$ oder IFN- γ^+ oder Tetramer $^+$) CD8 $^+$ -Zellen an (in den grauen Rahmen), bezogen auf die Gesamtzahl CD8 $^+$ T-Zellen. Die Zellpopulationen in den grauen Rahmen, sind diejenigen T-Zellen, welche als Peptid-spezifisch identifiziert und sortiert wurden.

1.1.2 Etablierung der Methoden zur TCR-Sequenzanalyse

Direkt im Anschluss an die FACS-Analyse wurde die zelluläre Gesamt-RNA der sortierten Zellen isoliert. Die isolierte RNA wurde in RACeready cDNA umgeschrieben und mittels RACE-PCR mit TCR α - und TCR β -Kette-spezifischen Primern (TRAC und TRBC) wurden die für die TCR-Ketten kodierenden Sequenzen amplifiziert. Abweichend von den Herstellerangaben mussten die einzusetzenden Mengen an RNA und cDNA sowie die Zyklenzahl modifiziert werden. Nach einem zweiten PCR-Lauf mit sog. „nested“ Primern wurden die PCR-Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen und analysiert (Abb III-3). Als Positivkontrolle wurden parallel mit den gleichen Primern die TCR-Ketten des etablierten zytotoxischen T-Zell-Klones IVS-B (spezifisch für das Tyrosinase-Peptid YMNGTMSQV; Wölfel et al., 2000) amplifiziert und ebenfalls auf das Agarosegel aufgetragen (Abb III-3, die beiden rechten Banden).

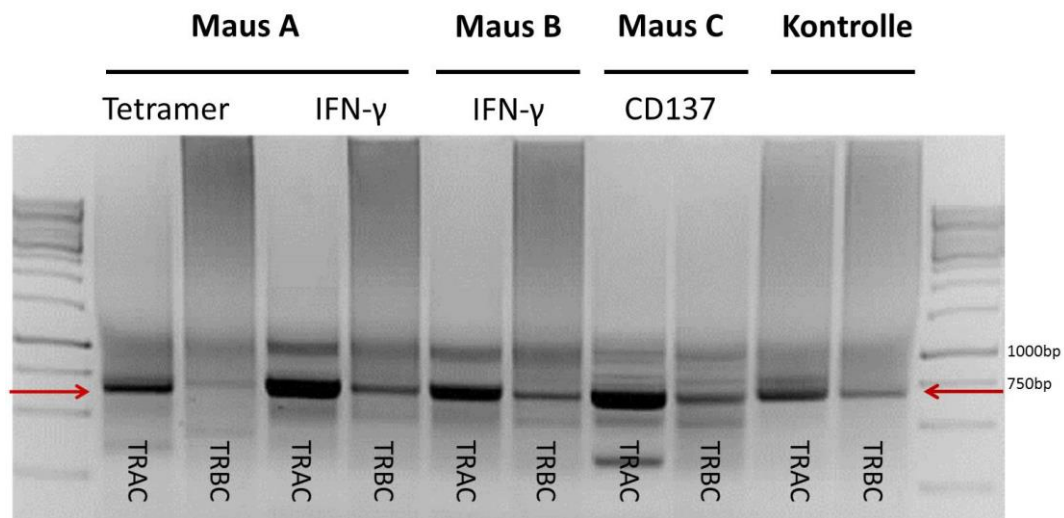


Abbildung III-3: Gelelektrophoretische Auftrennung der RACE-PCR-Produkte nach Amplifikation mit TCR α - und TCR β -Ketten-spezifischen nested Primern.

Nach der RNA-Isolierung wurden aus den 4 sortierten Proben (Maus A / Tetramer-sortiert; Maus A / IFN- γ Capture-sortiert; Maus B / IFN- γ Capture-sortiert und Maus C / CD137-sortiert) mittels RACE-PCR und TCR-spezifischer Primer die TCR α - (TRAC) und TCR β -Ketten (TRBC) amplifiziert. Dargestellt sind die Banden der PCR-Produkte nach dem 2. PCR-Lauf mit nested Primern nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Als Positivkontrolle für die TCR-Amplifikation diente RNA des T-Zell-Klones IVS-B mit bekannter TCR-Sequenz. Die roten Pfeile markieren die Höhe der DNA-Banden, deren Größe mit der Positivkontrolle übereinstimmt.

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte wurden die Banden auf Höhe der Positivkontrolle (AbbIII-3, ~750bp-Bande, markiert durch den roten Pfeil), als TCR-Ketten-DNA identifiziert. Bei allen 4 Proben konnten sowohl TCR α - als auch TCR β -Ketten-DNA amplifiziert werden. Die genannten Banden wurden aus dem Gel extrahiert, die Kontroll-DNA wurde direkt zur Sequenzanalyse an die Firma MWG geschickt. Dadurch wurde bestätigt, dass die mit den TCR-spezifischen Primern amplifizierten PCR-Produkte tatsächlich den bekannten TCR-Ketten des IVS-B-Klones entsprachen. Die aus dem Gel extrahierten PCR-Produkte der 4 Proben wurden blunt-end in pCR™ 4Blunt-TOPO®-Vektoren ligiert. Nach der chemischen Transformation kompetenter *E.coli*-Bakterien wurden diese auf Ampicillin-haltigen Agarplatten ausplattiert, um erfolgreich transformierte Bakterien zu selektieren und über Nacht bei 37°C kultiviert. Am nächsten Morgen konnten auf allen Platten Kolonien nachgewiesen

werden, jeweils 10 Kolonien wurden gepickt und über Nacht als Vorkulturen angesetzt. Aus den Vorkulturen wurde am nächsten Tag die Plasmid-DNA isoliert und mit den TCR-spezifischen Primern (nestedTRAC/TRBC) zur Sequenzanalyse geschickt.

Maus	Sortierung	TCR α / β -Kette	V α / β -Kette	J α / β -Region	D α / β -Region	CDR3-Sequenz
A	Tetramer	α	TRAV 26-2*01F	TRAJ53*01F		CILRDVGGGSNYKLTF
		α	TRAV13-1*01F	TRAJ20*01F		CAASPSNDYKLSF
		α	TRAV38-1*03(F)	TRAJ33*01F		CAFDSDNYQLIW (PHE118 not identified)
		β	-	-	-	-
A	IFN- γ Capture	α	TRAV 13-1*01F	TRAJ20*01F		CAASRDYKLSF
		α	TRAV 13-1*01F	TRAJ20*01F		CAASPSNDYKLSF
		β	TRBV27*01F	TRBJ2-7*01F	TRBD1*01 F	CASSLGQGGYEQYF
B	IFN- γ Capture	α	-	-		-
		β	TRBV27*01 F	TRBJ2-1*01 F	TRBD1*01 F	CASSSSGNEQFF
C	CD137	α	TRAV38-2/DV8*01F	TRAJ57*01F		CAYRILTQGGSEKLVF
		α	TRAV17*01F	TRAJ57*01F		CATGTQGGSEKLVF
		α	TRAV26-2*01F	TRAJ53*01F		CILRDVGGGSNYKLTF
		β	TRBV27*01 F	TRBJ2-5*01 F	TRBD1*01	CASLPSQETQYF

Abbildung III-4: Aus MART-1-immunisierten (ELA₂₆₋₃₅-Peptid) ABabDII-Mäusen isolierte TCR-Sequenzen

Gezeigt sind die TCR-Sequenzen der Peptid-spezifischen T-Zellen, die aus den 3 ELA-immunisierten ABabDII-Mäusen entweder mittels Tetramer-Färbung (Maus A), IFN- γ Capture Assay (Maus A und B) oder mittels CD137-Färbung (Maus C) isoliert wurden. Außer bei Maus B konnten jeweils TCR- α -Ketten (weiß unterlegt) identifiziert werden, außer bei der Tetramer-sortierten Probe von Maus A konnten jeweils TCR- β -Ketten (grau hinterlegt) identifiziert werden. Farblich dargestellt sind identische TCR-Sequenzen: die rot markierte TCR- α -Kette bei Maus A wurde identisch, sowohl mittels der Tetramer- als auch mittels IFN- γ Capture-Sortierung nachgewiesen; in ähnlicher Weise konnte die grüne TCR- α -Kette sowohl aus Maus A (nach Tetramerfärbung) als auch aus Maus C (CD137-Färbung) isoliert werden.

Die erhaltenen Sequenziererergebnisse haben gezeigt, dass es mit allen drei verwendeten Methoden möglich ist, T-Zellen spezifisch anzureichern. Auch wurde dadurch bestätigt, dass die Methoden zur Amplifikation der TCR-Sequenzen mittels RACE-PCR, nested RACE-PCR und blunt-end-Klonierung erfolgreich etabliert werden konnten. Selbst aus sehr geringen RNA-Mengen als

Ausgangsmaterial, konnten die enthaltenen TCR-Sequenzen amplifiziert und identifiziert werden. Durch den Nachweis einer identischen TCR α -Kette sowohl aus der Tetramer-sortierten als auch der IFN- γ Capture-sortierten Zellpopulation von Maus A konnte zudem gezeigt werden, dass nicht nur die Isolierung von T-Zellen, sondern die Isolierung der exakt gleichen TCR-Sequenz durch unterschiedliche Sortier-Methoden möglich ist.

Die sowohl aus Maus A als auch Maus C isolierte (in AbbIII-4 grün gekennzeichnete) TCR-Sequenz schien zunächst schwer erklärbar. Da diese TCR-Sequenz jedoch nur in 2 der 4 Proben nachgewiesen wurde, alle Proben jedoch stets in parallelen Ansätzen mit denselben Reagenzien und Primern amplifiziert wurden, konnte eine Kontamination ausgeschlossen werden. Zudem haben Trautmann et al. (2002) gezeigt, dass auch aus mehreren Melanoma-Patienten ELA-spezifische T-Zell-Klone mit identischen TCR α -Ketten isoliert werden konnten. Die bei den Studien von Trautmann et al. gezeigte Dominanz der TCR-V α -Kette (AV 12-2) wurde hier allerdings nicht beobachtet. Jedoch gibt der Nachweis identischer TCR α -Ketten (inkl. identischer CDR3-Regionen) durchaus einen Hinweis auf eine dominante bzw. bevorzugte TCR-Entwicklung bezüglich des MART-1-Antigens, wodurch der Nachweis identischer ELA-spezifischer TCR-Ketten in unterschiedlichen Individuen verständlicher wird.

Die hier beschriebenen Vorversuche ließen den Schluss zu, dass sowohl die T-Zell-Isolierung mittels IFN- γ -Capture-Assay als auch mittels CD137-Färbung, bezüglich Effizienz und Spezifität mit der Tetramer-basierten T-Zell-Isolierung vergleichbar sind. Aufgrund dieser Erkenntnis wurde die Entscheidung getroffen, die für diese Arbeit durchzuführenden Isolierungen Peptid-spezifischer T-Zellen mit diesen beiden Methoden durchzuführen, anstatt kostspielige, bezüglich ihrer Effizienz nicht etablierte Tetramere zu verwenden.

2. *In-vivo* Induktion Antigen-spezifischer T-Zellen in ABabDII Mäusen durch Immunisierung mit Prostatakrebs-assoziierten Peptiden

2.1 Wahl geeigneter Prostatakrebs-assoziiierter Peptide zur *in-vivo* Induktion Antigen-spezifischer T-Zellen

Bei der Auswahl geeigneter Peptide zur Immunisierung von ABabDII-Mäusen gibt es mehrere Faktoren, die zu berücksichtigen sind. Zum einen sollten Peptide ausgewählt werden, deren Aminosäuresequenzen nicht in murinen Selbstpeptiden vorkommen. Einer der großen Vorteile des ABabDII-Mausmodells besteht nämlich in der Möglichkeit, T-Zellen zu induzieren, welche hochaffin für humane Selbstpeptide sind. Im humanen System ist dies aufgrund der negativen Selektion hochaffiner, für Selbstpeptide spezifischer T-Zellen im Thymus nicht möglich. Werden ABabDII-Mäuse jedoch mit humanen Selbstpeptiden immunisiert, so sind diese Peptide für die Maus „fremd“ und T-Zellen mit hochaffinen T-Zell-Rezeptoren gegen diese Peptide werden nicht deletiert. Des Weiteren sollten die Peptide eine starke Bindungsaffinität für MHC-KlasseI-Moleküle (in diesem Fall HLA-A*02:01) aufweisen, um zu einer erfolgreichen T-Zell-Induktion zu führen. Zusätzlich ist es von Vorteil, Peptide auszuwählen, von denen bereits bekannt ist, dass sie auch natürlicherweise prozessiert und präsentiert werden und somit als Peptid-MHC-Komplex eine geeignete Zielstruktur für T-Zellen darstellen.

2.1.1 Klinische Daten, Peptid-MHC-Affinität und Spezies-Unterschiede in der Peptidsequenz als Entscheidungsgrundlage

Daten aus klinischen Studien, die am Klinikum Rechts der Isar und am Universitätsklinikum der LMU von Brill et al. (2007 und 2009) durchgeführt wurden, lieferten wichtige Informationen bezüglich der Eignung bestimmter CaP-assoziiierter Peptide zur Induktion T-Zell-basierter Immunantworten. Für diese Studien wurden 30 Patienten mit fortgeschrittenem, kastrationsresistentem

Prostatakrebs mit einer allogenen, IL-2- und IFN- γ -sezernierenden Prostatakrebszelllinie vakziniert. Hierzu wurde die HLA-A*02:01-positive Prostatakrebszelllinie LNCaP mit einem retroviralen Vektor transduziert, welcher die für die Zytokine IL-2- und IFN- γ kodierenden DNA-Sequenzen enthielt. Durch die Produktion dieser Zytokine konnten die Expression der MHC-Klasse-I-Moleküle hochreguliert, sowie Wachstumsfaktoren für T-Zellen bereitgestellt werden. Somit konnte die Eignung dieser Tumorzelllinie als Vakzine-Zellen deutlich verbessert werden. LNCaP-Zellen exprimieren zum einen Prostata-spezifische Antigene, aber auch Antigene, deren Expression nicht nur auf das Prostatagewebe limitiert ist (PSA, PAP, PSMA, PSCA, NY-ESO, Her-2/neu, Survivin, ect.). Für verschiedene immundominante Epitope (insgesamt 13) der von LNCaP-Tumorzellen exprimierten Antigene wurden auf Grundlage bereits publizierter Studien und hoher Peptid-MHC-Affinitäten Kandidaten-Peptide ausgewählt (siehe Tabelle III-1).

Tabelle III-1

Antigen	Peptidsequenz
EPCAM	ILYENNVIV
Her-2/neu	ALCRWGLLL
NY-ESO	SLLMWITQC
PAP	ALDVYNGLL
PCTA	IMVLKDKFQV
PRAME	SLLQHLIGL
PSA	FLTPKKLQCVDLHVISNDVCAQV
PSCA	ALQPGTALL und VLAGGFFLLMAGL
PSMA	ALVDIESKV und VLAGGFFLL
PSGR	ILLVMGVDV
PTH-rP	YLTQETNKV
Survivin	ELTLGEFLKL und TLPPAWQPF
STEAP	LLLGTHAL

Sowohl vor als auch nach jeder Immunisierung wurde den CaP-Patienten Blut abgenommen. Die PBMC wurden mit den verschiedenen pMHC-Liganden für 24h kokultiviert (also stimuliert) und mittels ELISPOT wurden dann die Frequenzen Peptid-spezifischer T-Zellen vor und nach Vakzinierung ermittelt. Die Frequenzanalyse Peptid-spezifischer T-Zellen lieferte äußerst wichtige

Informationen. Zum einen wurden auf diese Weise Antigene identifiziert, die aufgrund ihrer Immundominanz gute Zielantigene für eine Immunzell-basierte Krebstherapie darstellen. Zum anderen konnten von diesen Antigenen Peptide identifiziert werden, die vom humanen Immunsystem offenbar natürlicherweise prozessiert und präsentiert werden (also natürliche T-Zell-Epitope darstellen), da die Immunisierung zwar mit einer Tumorzelllinie, die *in-vitro*-Stimulationen jedoch mit Peptiden durchgeführt wurden.

Aufgrund der von Brill TH et al. durchgeführten Studien konnte für viele potentiell interessante Peptid-Kandidaten eine Rangliste bzgl. Ihrer „Immunogenität“ erstellt werden. Diese Rangliste (Tabelle III-2) gibt an, gegen welche Peptide die meisten Patienten nach der Immunisierung spezifische T-Zellen entwickelt hatten (Patienten in %). Somit wird eine direkte Aussage darüber getroffen, welche Peptide zur Induktion einer T-Zell-basierten Immunantwort am besten geeignet sind und sich somit auch am besten zur Immunisierung von ABabDII-Mäusen eignen.

Antigen	T-Zell-Antwort bei Patienten (in %)
Survivin	60,9
PTH-rP	60,9
PAP	54,2
PSCA	53,3
STEAP	50,0
PSMA	50,0
PCTA	43,5
PRAME	43,3
PSGR	43,3
PSA	36,7
NY-Eso	34,8
Her2/neu	34,8
EPCAM	32,2

Tabelle III-2: T-Zell-Induktionskapazität verschiedener CaP-assoziierter Peptide in Patienten mit kastrationsresistentem Prostatakarzinom

Die von Brill et al in ihren Studien untersuchten CaP-assozierten Peptide sind, entsprechend ihrer Kapazität, Peptid-spezifische T-Zell-Antworten in den immunisierten Patienten zu induzieren aufgelistet (angegeben in % der Patienten, bei denen nach der Immunisierung spezifische T-Zellen nachgewiesen werden konnten; T-Zell-Frequenzen vor der Immunisierung sind hier nicht berücksichtigt) Rot markiert sind die Antigene, von denen Peptide zur Immunisierung der ABabDII-Mäuse ausgewählt wurden.

Die ausgewählten Peptide wurden nun mithilfe der Datenbanken „Syfpeithi“, „BIMAS“ und „IEDB“ bezüglich ihrer Bindungskapazität an das MHC-Klasse-I-Molekül HLA-A*02:01 überprüft (Tabelle III-3). Eine starke Bindungsaffinität zwischen Peptid und MHC-Molekül kann entscheidend für eine erfolgreiche Präsentation und somit T-Zell-Stimulation sein (Engels et al., 2013; Kammertoens et al., 2013). Daher ist es nur sinnvoll, Peptide mit entsprechend starker Peptid-MHC-Affinität (hoher sog. „Score-Wert“) für die *in-vivo* Induktion von T-Zellen in ABabDII-Mäusen auszuwählen.

Peptid	Peptid-Sequenz	Syfpeithi Score*	BIMAS Score**	IEDB IC50(nM)***
PSA	FLTPKKLQCVD- LHVISNDVCAQV	KLQCVDLHV 22	LTPKKLQCV 3.777	9352.05
		LTPKKLQCV 21	FLTPKKLQC 22.853	102.33
		FLTPKKLQCV 26	KKLQCVDLH 0.002	1217.9
		KLQCVDLHVI 24	KLQCVDLHVI 243.432	5.92
		VISNDVCAQV 21	VISNDVCAQ 0.008	578.28
PSMA	ALFDIESKV	ALFDIESKV 26	ALFDIESKV 1055.104	12.59
	VLGGFFLL	VLGGFFLL 27	VLGGFFLL 400.203	10.78
PSCA	VLLALLMAGL	VLLALLMAGL 26		56.34
		LLALLMAGL 28	LLALLMAGL 83.527	60.04
		VLLALLMAG 19	VLLALLMAG 1.078	-
	ALQPGTALL	ALQPGTALL 30	ALQPGTALL 21.362	30.86
EPCAM	ILYENNVIV	ILYENNVIV 27	ILYENNVIV 636.028	14.46
PSGR	ILLVMGVDV	ILLVMGVDV 26	ILLVMGVDV 437.482	382.13
STEAP	LLGTHAL	LLGTHAL 32	LLGTHAL 309.050	15.19
PRAME	SLYSFPEPEA	SLYSFPEPE 14	SLYSFPEPEA 0.089	37.13
		SLYSFPEPEA 20	LYSFPEPEA 0.001	-
			SLYSFPEPE 12.60	10906.11
	SLLQHLIGL	SLLQHLIGL 29	SLLQHLIGL 181.794	20.35
PAP	ALDVYNGLL	ALDVYNGLL 23	ALDVYNGLL 1.111	260.77
			ALDVYNGL 11.10	-

PCTA	IMVLKDKFQV	M V L K D K F Q V 16	MVLKDKFQV 222.022	82.02
		I M V L K D K F Q V 20	IMVLKDKFQ 0.101	198.49
PTH-rP	YLTQETNKV	Y L T Q E T N K V 26	YLTQETNKV 319.939	38.88
NY-ESO	SLLMWITQC	S L L M W I T Q C 18	SLLMWITQC 42.278	1111.54
			SLLMWITQ 2.50	-
Survivin	TLPPAWQPFL	T L P P A W Q P F L 23		475.82
		L P P A W Q P F L 13	LPPAWQPFL 1.304	-
		T L P P A W Q P F 12	TLPPAWQPF 0.127	15936.82
			TLPPAWQP 14.70	-
	ELTLGEFLKL	E L T L G E F L K L 19		2381.67
		L T L G E F L K L 23	ELTLGEFLKL 3.004	2606.61
		E L T L G E F L K 8	LTLGEFLKL 3.546	-
			ELTLGEFLK 0.006	-
Her2/ Neu	ALCRWGLLL	A L C R W G L L L 23	ALCRWGLLL 21.362	172.99

Tabelle III-3: Peptid-MHC-Affinität verschiedener Antigen-Peptide

Angegeben sind die Peptid-MHC-Affinitäten verschiedener CaP-assoziiierter Peptide, welche mit Hilfe der Datenbanken Syfpeithi, BIMAS und IEDB ermittelt wurden. Die jeweils zur Wertung angegebenen Scores berechnen sich für jede Datenbank anders. *Syfpeithi: die Scores des Syfpeithi-Algorithmus geben eine relative Wertung der Bindungskapazität an, mit 36 als dem höchst möglichen Score (stärkste Bindungskapazität). **BIMAS: die angegebenen Scores beziehen sich auf die geschätzte Dissoziations-Halbwertszeit des Peptid:MHC-Komplexes bei 37°C und einem pH von 6,5 (größere Werte bedeuten eine größere Peptid-MHC-Affinität). ***IEDB: angegeben werden die prognostizierten IC₅₀ in nM (die Konzentration eines Peptides die nötig ist, um die Hälfte eines Indikator-Peptids vom MHC zu verdrängen = half maximal peptide displacing concentration in nM). Dabei indizieren geringe Werte eine hohe Affinität (IC₅₀-Werte < 50nM bedeuten eine hohe Affinität; IC₅₀-Werte < 500nM bedeuten eine mittlere Affinität; IC₅₀-Werte > 500nM bedeuten eine geringe Affinität). Rot markiert sind diejenigen Peptide, die zur Immunisierung der ABabDII-Mäuse im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendet wurden.

Eine weitere Grundvoraussetzung für die zur Immunisierung der ABabDII-Mäuse verwendeten Peptide stellte deren Aminosäuresequenz dar, welche das Immunsystem der Maus als „fremd“ erkennen sollte. Deshalb wurden alle humanen Kandidaten-Antigene dahingehend überprüft, ob diese Antigene auch im murinen System exprimiert werden. War dies der Fall, so wurde zusätzlich überprüft, ob identische oder zu den humanen Peptiden unterschiedliche Peptid-Sequenzen vorlagen (Tabelle III-4).

Gen	Peptid-Sequenz	Transkript-varianten im humanen System	Transkript-varianten im murinen System
PSA (KLK3)	FLTPKKLQCVDL HVISNDVCAQV	KLK3-201 FLTPKKLQCVDLHVISNDVCAQV KLK3-203 FLTPKKLQCVDLHVISNDVCAQV KLK3-204 FLTPKKLQCVDLHVISNDVCAQV	Antigen in der Maus nicht exprimiert
PSMA (FOLH)	ALFDIESKV / VLGGFFLL	FOLH-001 VLGGFFLL + ALFDIESKV FOLH-002 VLGGFFLL + ALFDIESKV FOLH-003 ALFDIESKV FOLH-004 ALFDIESKV	Folh1-001 ALFDI S SKV Folh1-002 ALFDI S SKV
PSCA	VLLALLMAGL / ALQPGTALL	PSCA-201 VLLALLMAGL + ALQPGTALL	PSCA-201 AL H PG A AL Q
EPCAM	ILYENNVIV	EPCAM -001 ILYENNVIT	EPCAM-201 I M YENNVIT
PSGR* (Olf78)	ILLVMGVDV	OR51E2-001 ILLVMGVDV	Olf78-201 ILLVMGVDV Olf78-202 ILLVMGVDV
STEAP	LLLGTHAL	STEAP1-001 LLLGTHAL	Steap-001 L I L S T M H T L Steap-002 L I L S T M H T L Steap-003 L I L S T M H T L

PRAME	SLYSFPEPEA / SLLQHLIGL	PRAME-001 SLYSFPEPEA + SLLQHLIGL PRAME-003 SLYSFPEPEA + SLLQHLIGL PRAME-004 SLYSFPEPEA + SLLQHLIGL	PRAME-001 SL TD H L DSL + DTLQHLAIN
PAP (ACPP)	ALDVYNGLL	ACPP-001 ALDVYNGLL ACPP-003 ALDVYNGLL	ACPP-001 ALDVYNG V L ACPP-003 ALDVYNG V L
PCTA (Lgals08)	IMVLKDKFQV	LGALS08-001 IMVLKDKFQV LGALS08-002 IMVLKDKFQV LGALS08-003 IMVLKDKFQV LGALS08-007 IMVLKDKFQV LGALS08-008 IMVLKDKFQV LGALS08-014 IMVLKDKFQVA	Lgals08-001 F MVLK N KFQV Lgals08-004 F MVLK N KFQV
PTH-rP* (Pthlh)	YLTQETNKV	PTHLH-001 YLTQETNKV PTHLH-002 YLTQETNKV PTHLH-003 YLTQETNKV PTHLH-008 YLTQETNKV	Pthlh-001 YLTQETNKV
NY-ESO (CTAG1B)	SLLMWITQC	CTAG1B 002 SLLMWITQC	Antigen in der Maus nicht exprimiert
Survivin (Birc5)	TLPPAWQPFL / ELTLGEFLKL	BIRC5-201 TLPPAWQPFL + ELTLGEFLKL BIRC5-202 TLPPAWQPFL + ELTLGEFLKL BIRC5-203 TLPPAWQPFL	Birc5-001 ELT V S E FLKL Birc5-002 ELT V S E FLKL
Her2/neu (ErbB2)	ALCRWGLLL	ERBB2-201 ALCRWGLLL	ErbB2-001 A W CRWG F LL

Tabelle III-4: Sequenzen CaP-assoziiierter Peptide, humane und murine Sequenzen im Vergleich

Unter „Peptidsequenzen“ sind die Sequenzen der in den Studien von Brill et al. zur *in vitro* Stimulation verwendeten Peptide aufgeführt. Daneben sind die im humanen und murinen System existierenden Transkriptvarianten der jeweiligen Antigene mit den entsprechenden Peptidsequenzen aufgeführt. Gelb unterlegt sind die im murinen System vom humanen System abweichenden Aminosäuren. Die mit * markierten Peptide sind diejenigen, die aufgrund identischer Peptidsequenzen im humanen und murinen System für eine Immunisierung der ABabDII-Mäuse nicht in Frage kamen (PSGR und PTH-rP). Rot markiert sind diejenigen Peptid-Sequenzen, die letztendlich zur Immunisierung verwendet wurden.

Aufgrund der aus den klinischen Studien von Brill TH et al. bekannten Daten, der Peptid-MHC-Bindungsaffinitäten und der Peptidsequenzen wurden dann die für eine Immunisierung der ABabDII-Mäuse und *in vivo* T-Zell-Induktion am Besten geeigneten Peptide ausgewählt (Tabelle III-5; in Tabelle III-2, III-3 und III-4 jeweils rot markiert). Es handelte sich dabei um Peptide der Antigene PSA, PSCA, PCTA, PRAME, PSMA und STEAP.

Tabelle III-5 Zur Immunisierung der ABabDII-Mäuse ausgewählte Peptide

Antigen	Peptidsequenz
PCTA	IMVLKDKFQV
PSA	FLTPKKLQCVDLHVISNDVCAQV
PSCA	ALQPGTALL
PSMA	ALFDIESKV
PRAME	SLLQHLIGL
STEAP	LLLGTIHAL

2.2 Immunisierung der ABabDII-Mäuse und Analyse der murinen PBMC auf Peptid-spezifische T-Zellen

Für die Immunisierung der ABabDII-Mäuse wurden sechs ausgewählte Peptide (Tabelle III-5) CaP-assoziiierter Antigene verwendet. Die Immunisierung ist in Kapitel II, Abschnitt 2.6.2 beschrieben und erfolgte nach dem in Abbildung III-5 dargestellten Schema.

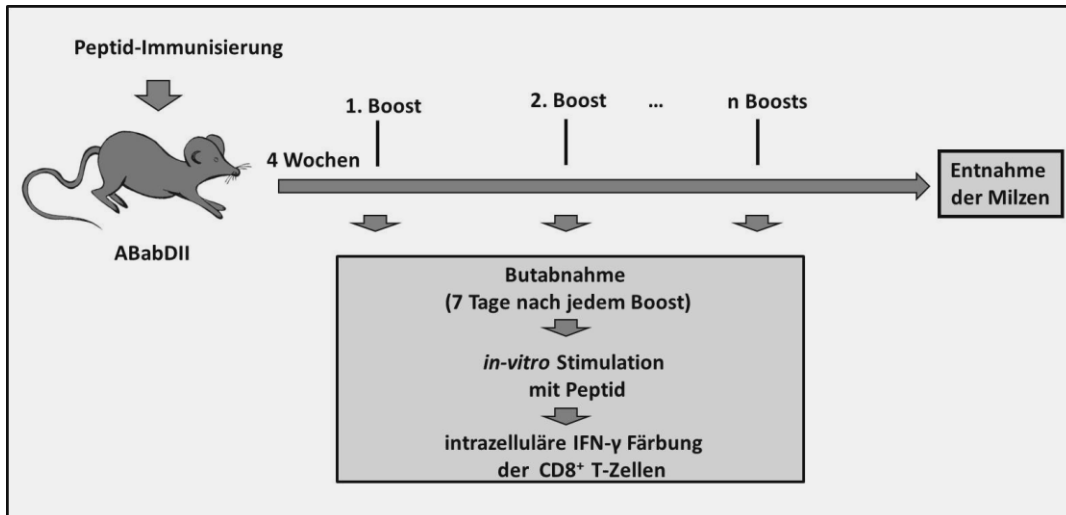


Abbildung III-5: Immunisierungsschema der ABabDII-Mäuse

7 Tage nach jedem Boost wurde den Tieren Blut abgenommen und die PBMC wurden mittels intrazellulärer IFN- γ -Färbung nach *in-vitro*-Stimulation mit dem jeweiligen Peptid auf das Vorhandensein Peptid-spezifischer T-Zellen untersucht. Die gefärbten Zellen wurden im FACS analysiert und der Prozentsatz IFN- γ -positiver T-Zellen, anteilig an den CD8⁺ T-Zellen wurde ermittelt (beispielhaft dargestellt in Abbildung III-6). Als Negativkontrolle dienten jeweils unstimulierte bzw. mit einem irrelevanten Peptid stimulierte PBMC derselben Maus.

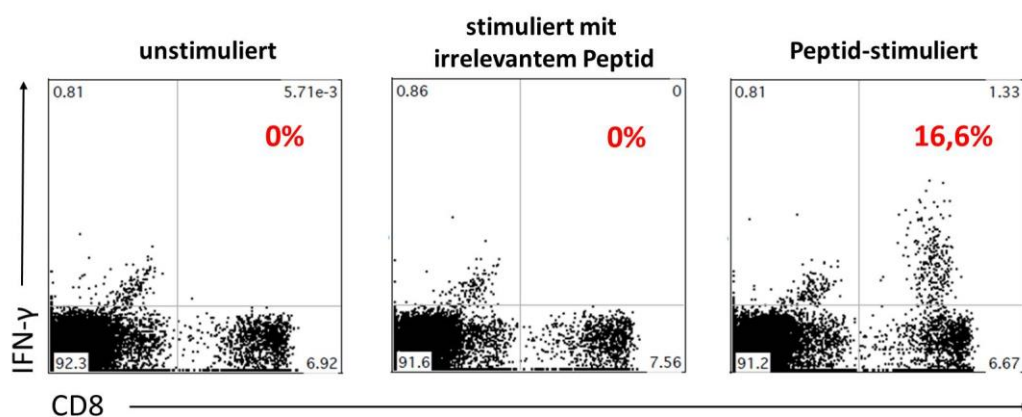


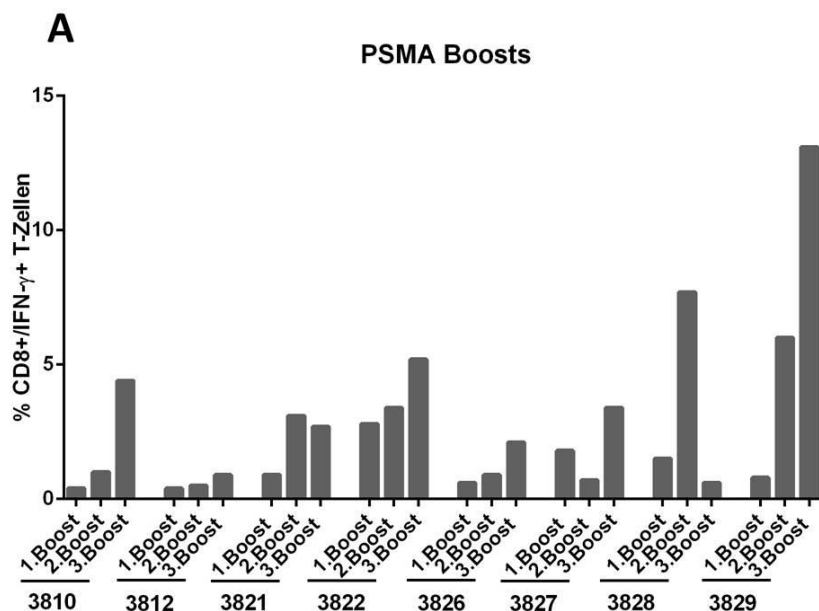
Abbildung III-6: FACS-Analyse PRAME-Peptid-spezifischer T-Zellen in AbabDII-Mäusen

Exemplarisch dargestellt sind die mit einem CD8- und IFN- γ -spezifischen Antikörper gefärbten PBMC einer Peptid-immunisierten Maus. Die PBMC

wurden entweder unstimuliert, nach Stimulation mit einem irrelevanten Peptid oder nach Stimulation mit dem PRAME-Peptid gefärbt. Rot angegeben ist der Prozentsatz IFN- γ -positiver Zellen, anteilig an den CD8-positiven T-Zellen.

Die mit dem PSA- und dem PCTA-Peptid immunisierten Versuchsgruppen (6 bzw. 9 Tiere) wurden nach der ersten Immunisierung jeweils noch 2x geboostet. Da jedoch bei keinem der Tiere PSA- bzw. PCTA-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden konnten (Daten nicht gezeigt), wurden diese Tiere aus dem Versuch genommen.

In den PSMA-, PRAME-, STEAP- und PSCA-immunisierten Versuchsgruppen hingegen konnten Peptid-spezifische T-Zellen erfolgreich induziert und nachgewiesen werden (Abbildung III-7). Die FACS-Histogramme der in den einzelnen Tieren induzierten CD8⁺/IFN- γ ⁺ T-Zellen nach den verschiedenen Boosts sind in Abbildung III-7.1 im Anhang ausführlich dargestellt.



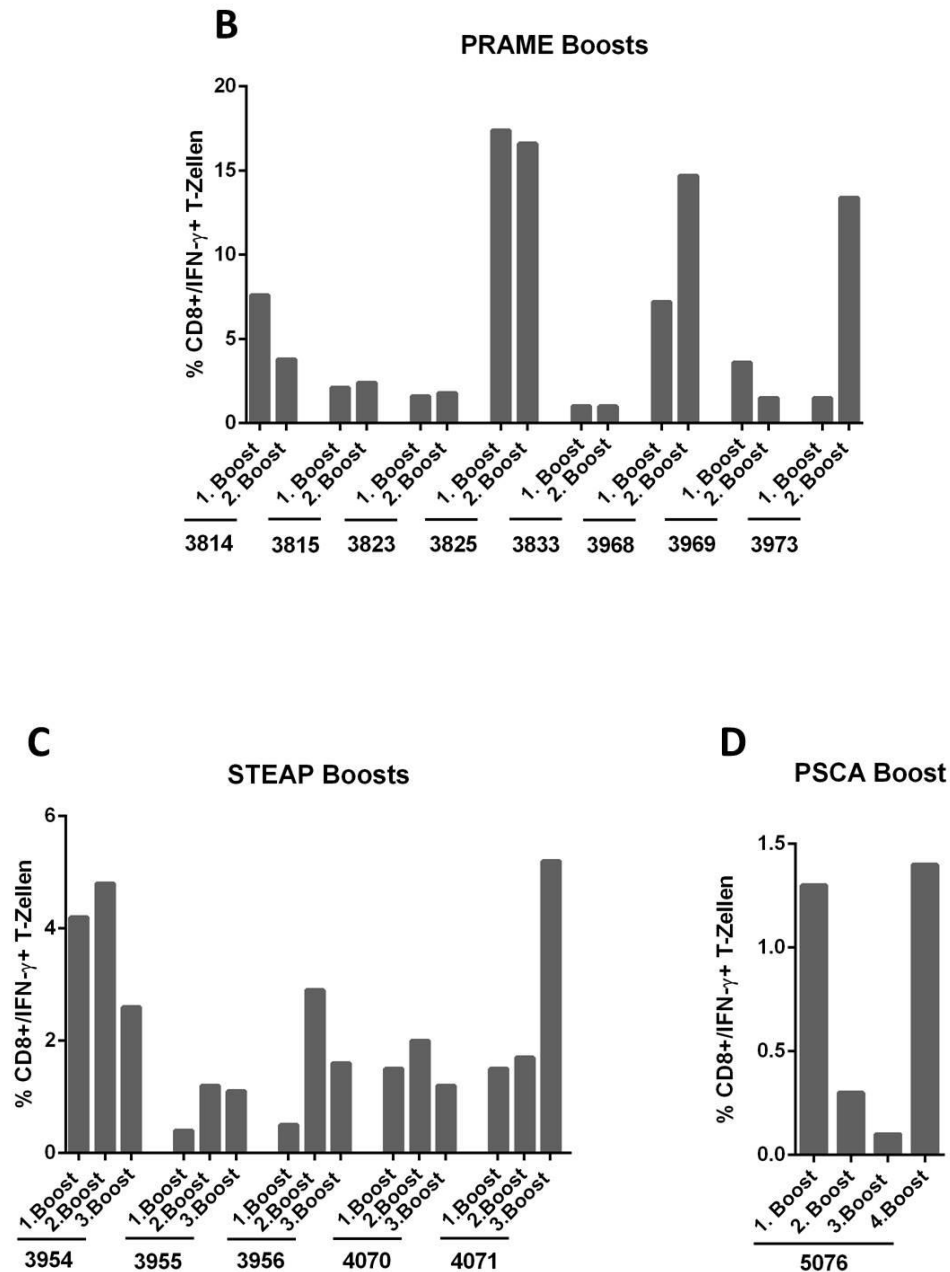


Abbildung III-7: Frequenz CD8⁺/IFN-γ⁺ T-Zellen in ABabDII-Mäusen

Gezeigt ist jeweils der nach *in vitro*-Peptidstimulation und anschließender Antikörperfärbung im FACS ermittelte Prozentsatz IFN-γ-positiver Zellen, anteilig an den CD8-positiven T-Zellen. Dargestellt sind die Analysen nach jedem Boost (außer dem letzten Boost vor Tötung der Tiere) für die Antigene PSMA (A), PRAME (B), STEAP (C) und PSCA (D). Gezeigt sind jeweils nur die Tiere (ID-Nummern angegeben), bei denen eine T-Zell-Induktion erfolgreich war und deren Milzen letztendlich auch zur Anreicherung spezifischer T-Zellen verwendet werden konnten.

2.3 Isolierung Peptid-spezifischer T-Zellen aus ABAbDII-Mäusen

Insgesamt wurden die Tiere der PRAME-Gruppe 3x geboostet, die Tiere der PSMA- und STEAP-Gruppe wurden 4x geboostet und die Tiere der PSCA-Gruppe wurden 5x geboostet. Jeweils 7 Tage nach dem letzten Boost wurden die Tiere, bei denen zuvor Peptid-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden konnten, getötet. Die spezifischen Zellen wurden entweder nach Durchführung eines IFN- γ -Capture-Assays oder nach CD137-Färbung mittels Sortierung angereichert. Die bei den FACS-Analysen für die Sortierungen verwendete „Gating-Strategie“ ist in Abbildung III-8 beispielhaft dargestellt. Als Kontrolle wurden für jede Maus parallel unstimulierte Zellen gefärbt und analysiert (nicht gezeigt), was für das korrekte Setzen des für die Sortierung entscheidenden Gates (Abbildung III-8 A und B, jeweils Blot ganz rechts) nötig war.

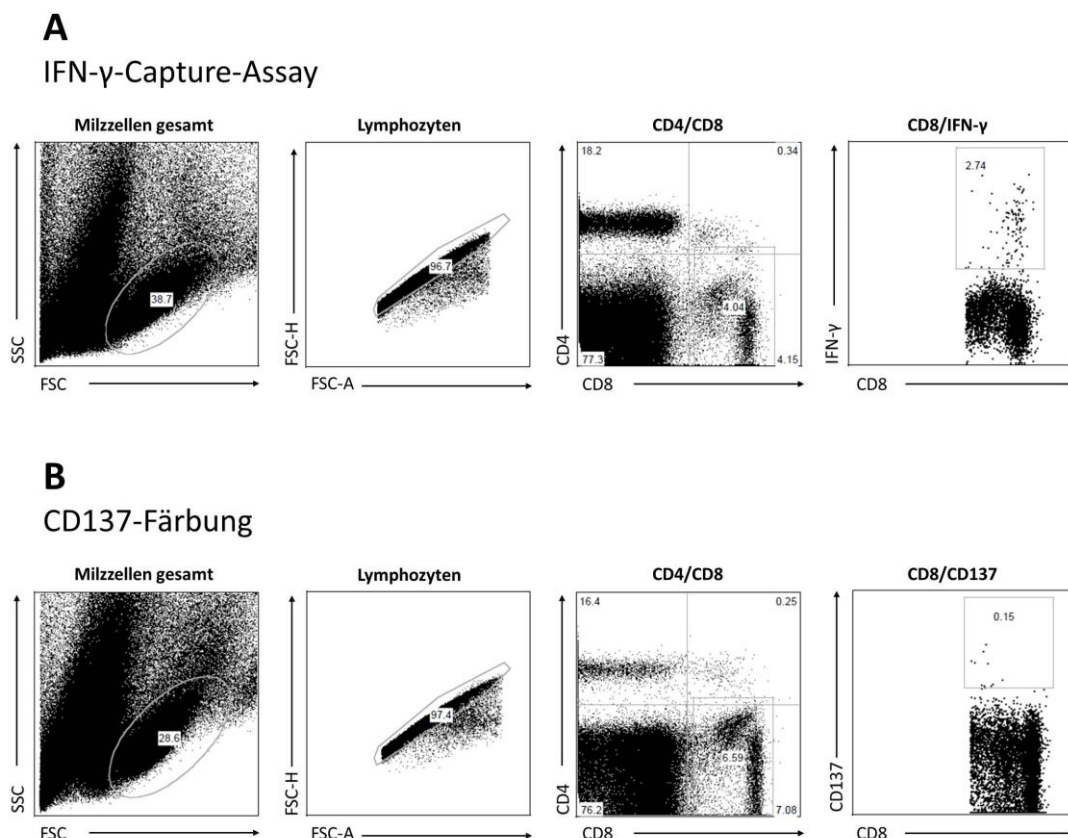


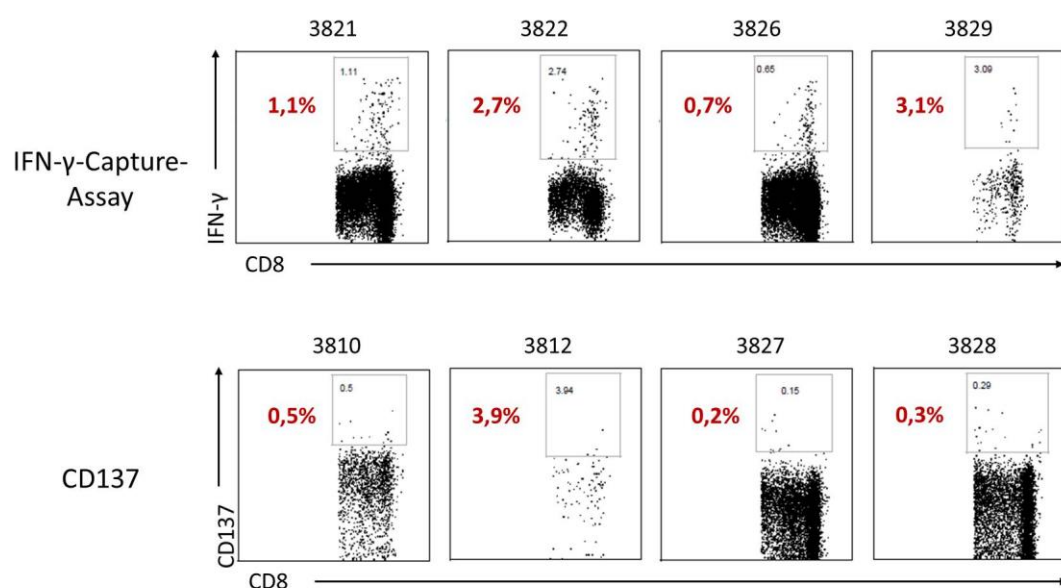
Abbildung III-8: Gating-Strategie der für die Sortierungen durchgeführten FACS-Analysen nach IFN- γ -Capture-Assay (A) bzw. nach CD137-Färbung (B)

Nach Betrachtung der Gesamt-PBMC (jeweils Blot ganz links) wurde im nächsten Blot (2. v.l.) selektiv die Lymphozyten-Population dargestellt. Durch Auftragung von FSC-A gegen FSC-H konnten Dupletten innerhalb der Lymphozyten-Population sichtbar gemacht werden. Nach Ausgrenzung der Dupletten wurde die CD4- und CD8-Färbung der Einzelzell-Lymphozyten betrachtet (2. v.r.) und nach Ausgrenzung der CD4-positiven T-Zellen wurden selektiv die CD8-positiven Lymphozyten betrachtet (Blot ganz rechts). Dabei wurde CD8 entweder gegen IFN- γ oder CD137 aufgetragen um die Peptid-spezifischen T-Zellen darzustellen. Durch direkten Vergleich mit einer unstimulierten, parallel gefärbten PBMC-Probe derselben Maus (nicht gezeigt) konnte das Gate für die Sortierung gesetzt werden (grauer Rahmen im rechten Blot). Alle Zellen die in diesem Gate lagen wurden sortiert.

Insgesamt konnten die Peptid-spezifische T-Zellen von 8 PSMA-immunisierten, 5 STEAP-immunisierten, 8 PRAME-immunisierten und einer PSCA-immunisierten ABabDII-Maus induziert und angereichert werden. Die zugehörigen FACS-Histogramme der jeweiligen Sortierungen sind in Abbildung III-9 gezeigt. Die jeweils mit einem grauen Gate eingegrenzten Zellen wurden isoliert.

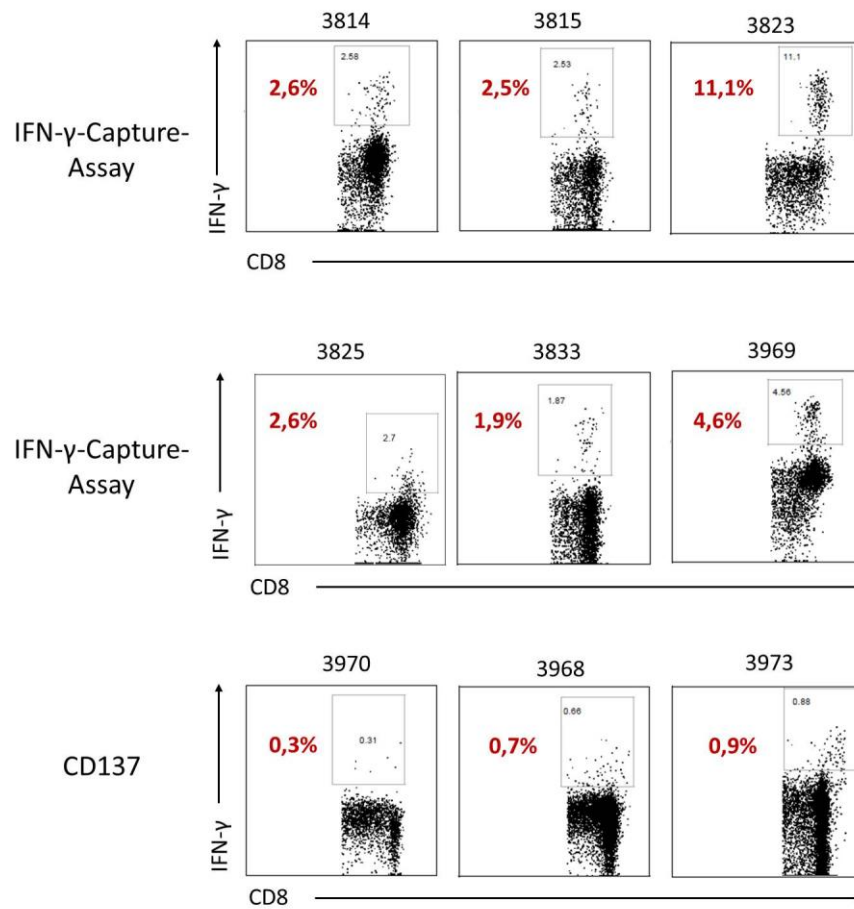
A

PSMA-immunisierte ABabDII-Mäuse

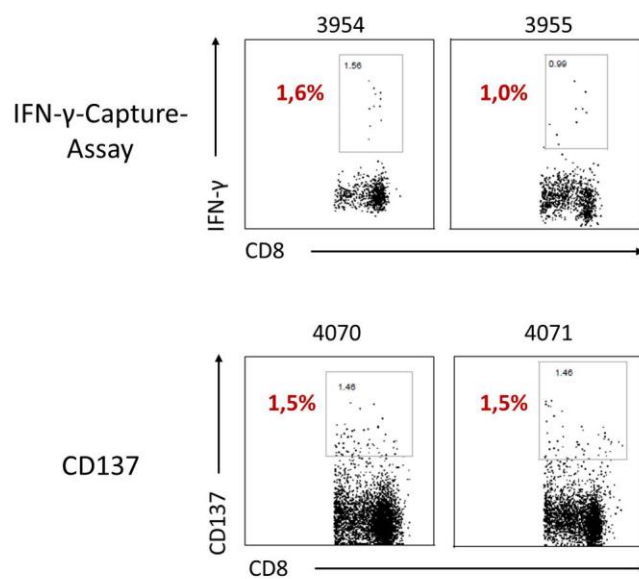


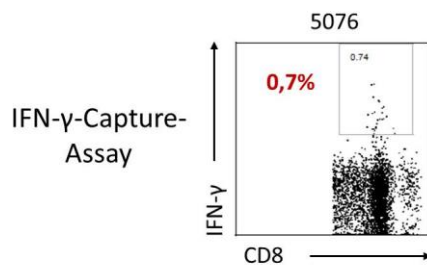
B

PRAME-immunisierte ABabDII-Mäuse

**C**

STEAP-immunisierte ABabDII-Mäuse

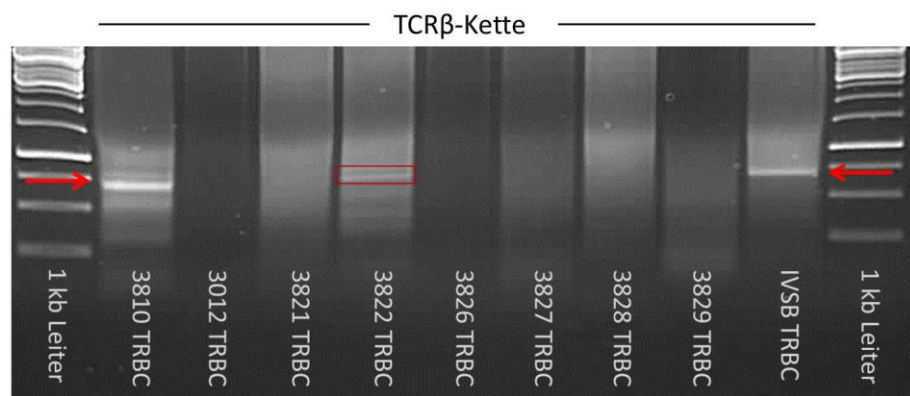
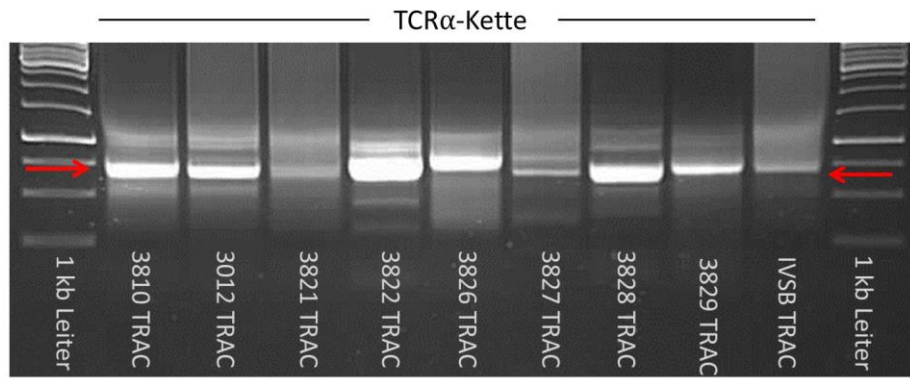
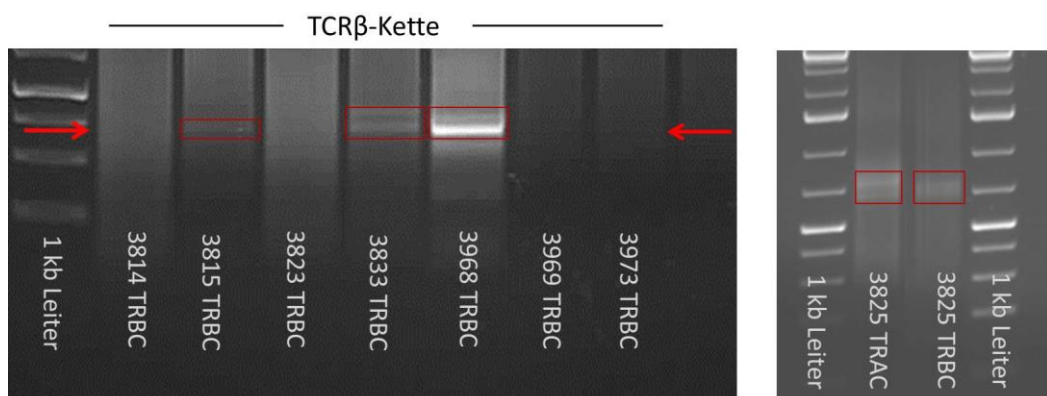
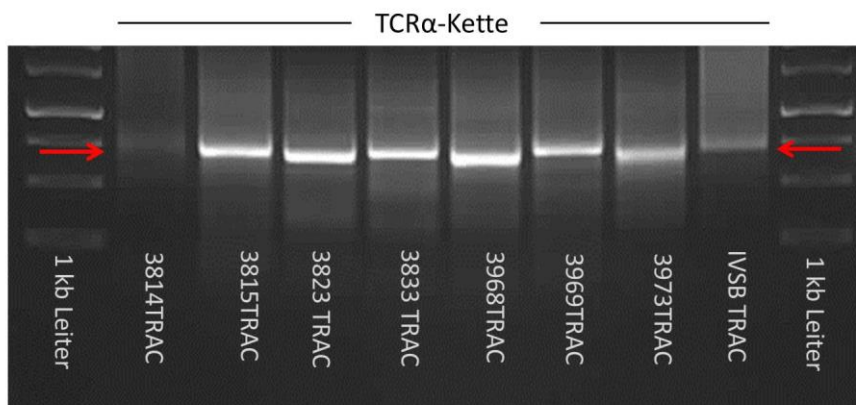


D**PSCA-immunisierte ABabDII-Maus****Abbildung III-9: FACS-Analyse und Sortierung Peptid-spezifischer T-Zellen**

Dargestellt sind die FACS-Analysen der entweder IFN- γ -Capture- oder CD137-gefärbten Milzzellen der PSMA-immunisierten (**A**), PRAME-immunisierten (**B**), STEAP-immunisierten (**C**) und PSCA-immunisierten (**D**) ABabDII-Mäuse (die Maus-ID ist über jedem Blot angegeben). Durch Anwendung der in Abbildung III-8 gezeigten Gating-Strategie wurden die Peptid-spezifischen CD8-positiven T-Zellen identifiziert. Die in den grauen Rahmen gekennzeichneten Zellen wurden angereichert. Es konnten zwischen 2100 und 11500 Zellen angereichert werden.

2.4 Isolierung von TCR-Sequenzen aus den angereicherten, Peptid-spezifischen T-Zellen

Nach Anreicherung der Peptid-spezifischen T-Zellen wurde die zelluläre Gesamt-RNA dieser Zellen isoliert. Mithilfe der TCR α - und TCR β -Ketten-spezifischen Primer (TRAC, TRBC, nested TRAC und nested TRBC) wurden mittels RACE-PCR und nested RACE-PCR die TCR-Sequenzen dieser T-Zell-Populationen amplifiziert. Wie bereits bei den Versuchen in Kapitel III Abschnitt 1.1.2 beschrieben, wurde als Kontrolle die zelluläre Gesamt-RNA des IVS-B-T-Zell-Klones parallel amplifiziert. Nach der PCR wurden die Amplifikate zur Beurteilung der Produktgröße auf ein Agarose-Gel mit einer 1kb-Leiter zusammen aufgetragen und mit einem UV-Transilluminator analysiert und aufgenommen (Abbildung III-10).

A**B**

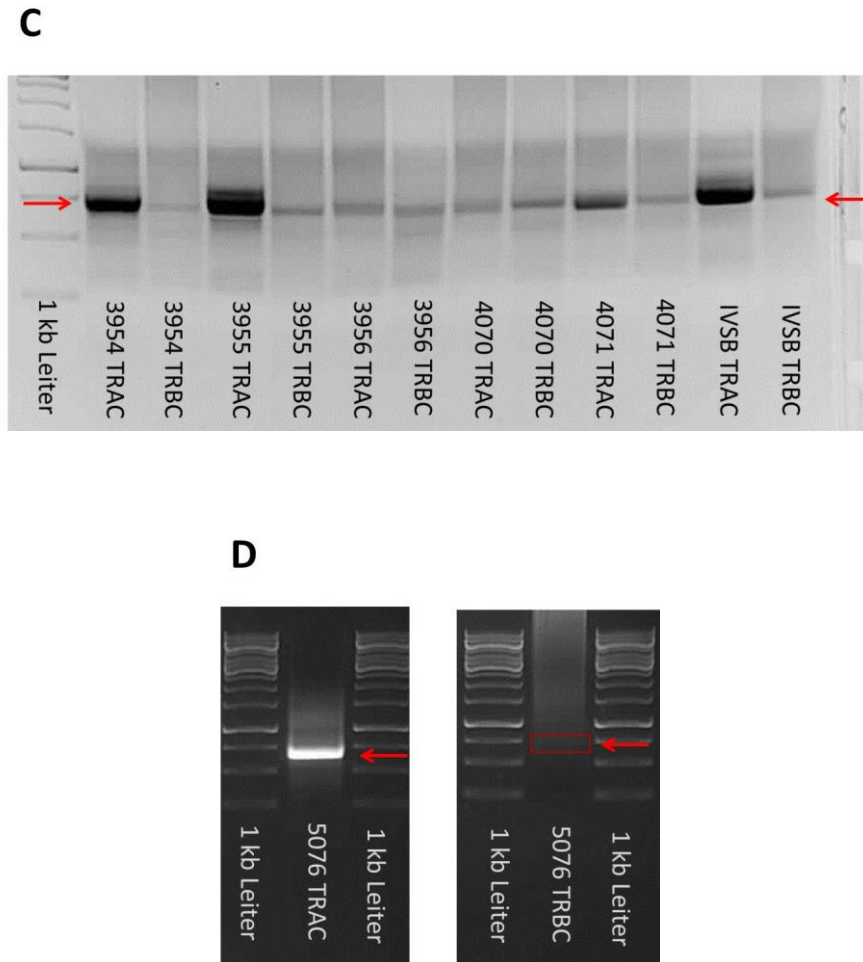


Abbildung III-10: Gelelektrophoretische Auftrennung der RACE-PCR-Produkte nach Amplifikation mit TCR α - und TCR β -Ketten-spezifischen nested Primern

Nach der RNA-Isolierung wurden aus allen Proben mittels RACE-PCR und TCR-spezifischer Primer die DNA der TCR α - (TRAC) und TCR β -Ketten (TRBC) amplifiziert. Dargestellt sind die Banden der PCR-Produkte nach dem 2. PCR-Lauf mit nested-Primern nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Als Positivkontrolle für die TCR-Amplifikation diente RNA des zytotoxischen T-Zell-Klones IVS-B (spezifisch für das Tyrosinase-Peptid YMNGTMSQV) mit bekannter TCR-Sequenz. Die roten Pfeile markieren die Höhe der DNA-Banden, deren Größe mit der Positivkontrolle übereinstimmt. Die roten Kästchen deuten auf schlecht sichtbare aber doch vorhandene Banden hin.

Gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden die TCR-Amplifikate der angereicherten T-Zellen aus den PSMA-immunisierten Mäusen (**A**), aus den PRAME-immunisierten Mäusen (**B**), aus den STEAP-immunisierten Mäusen (**C**) und aus der PSCA-immunisierten Maus (**D**).

Die DNA-Banden in der Höhe von 750bp (vgl. IVS-B-Kontrolle) wurden als TCR α - bzw. TCR β -Ketten-DNA identifiziert und aus dem Agarosegel extrahiert. Eine Amplifikation der TCR α -Sequenzen war bei allen Proben möglich. Die TCR β -Sequenzen konnten hingegen auch nach wiederholter Durchführung der PCR nur bei 2 PSMA-Mäusen (ID: 3810 und 3822) und bei 4 PRAME-Mäusen (ID: 3815, 3825, 3833 und 3968) amplifiziert werden. Auch bei der PSCA-Maus (ID: 5076) und bei allen STEAP-Mäusen (ID: 3954, 3955, 3956, 4070 und 4071) konnten die Sequenzen der TCR α - und TCR β -Ketten amplifiziert werden.

Nach Extraktion der DNA-Banden aus dem Agarosegel wurden die TCR-Sequenzen einzeln, blunt-end in „pCR™ 4Blunt-TOPO®“-Vektoren ligiert. Anschließend wurden chemisch kompetente E.coli mit je einem Vektor transformiert, der entweder die TCR α - oder TCR β -Ketten-Sequenz einer Probe enthielt. Die Bakterien wurden im Anschluss an die Transformation auf Agarplatten ausgebracht und über Nacht inkubiert. Die nach dem Ausplattieren gewachsenen Einzelkolonien (welche nun jeweils Plasmide mit einer einzigen TCR-Sequenz enthielten) wurden selektiert, expandiert und die enthaltene Plasmid-DNA wurde isoliert und zur Sequenzanalyse eingeschickt. Die identifizierten TCR-Sequenzen sind in den Tabellen III-6 bis III-9 aufgeführt. (Nomenklatur nach IMGT). Zusätzlich angegeben sind die Identifikationsnummern der Tiere (ID), die Methode die zur Sortierung verwendet wurde und die Anzahl (#), wie oft eine Sequenz gefunden wurde. Die am häufigsten vorkommenden TCR α - (weiß unterlegt) und TCR β -Sequenzen (grau unterlegt) sind dabei jeweils rot markiert. In Abbildung III-11 sind zur besseren Übersicht die Häufigkeiten der isolierten TCR-Ketten (jeweils nach den CDR3-Regionen bezeichnet) für jede Maus einzeln dargestellt.

Tabelle III-6: PSMA-TCR-Sequenzen

Maus ID	Sor-tierung	α/β	V-Region	J-Region	D-Region	CDR3	#
3810	CD137	α	TRAV13-1*01 F	TRAJ41*01 F		CAASRNSNSGYALNF	2/4
		α	TRAV13-2*01F	TRAJ22*01 F		CAENRGRSSGSARQLTF	1/4
		α	TRAV27*01 F	TRAJ24*02 F		CAGVTTDSWGKLQF	1/4
		β	TRBV4-1*01 F	TRBJ2-1*01F	TRBD1*01 F	CASSPTGFEEQFF	2/9
		β	TRBV12-3*01 F	TRBJ2-7*01F	TRBD2*02 F	CASSLWREQYF	1/9
		β	TRBV12-4*01 F	TRBJ2-7*01F	TRBD1*01 F	CASSLGQGYEQYF	1/9
		β	TRBV12-4*01 F	TRBJ2-7*01F	TRBD2*02 F	CASSLYPAGVHEQYF	1/9
		β	TRBV13*01 F	TRBJ2-1*01F	TRBJ2-1*01F	CASSFTGVPYNEQFF	1/9
		β	TRBV7-9*03 F	TRBJ2-1*01F	-	CASSLSNNEQFF	1/9
		β	TRBV7-9*03 F	TRBJ2-7*01F	TRBD1*01 F	CASSLGQGMSYEQYF	1/9
		β	TRBV12-4*01 F	TRBJ2-7*01F	TRBJ2-7*01F	CASSLTSGSEQYF	1/9
3822	IFN- γ	α	TRAV12-3*01 F	TRAJ54*01 F		CAMRVQGAQKLVF	8/10
		α	TRAV13-2*01 F	TRAJ29*01 F		CAENMGSGNTPLVF	1/10
		α	TRAV17*01 F	TRAJ47*02 F		CATDAGEYGNKLVF	1/10
		β	TRBV6-5*01 F	TRBJ2-1*01F	TRBJ2-1*01F	CASSYGTGHNEQFF	5/7
		β	TRBV27*01 F	TRBJ2-7*01F	TRBD2*02 F	CASSPLAGGPPSYEQYF	1/7
		β	TRBV12-4*01 F	TRBJ2-1*01F	TRBD2*02 F	CASSRAGYNEQFF	1/7

Tabelle III-7: PRAME-TCR-Sequenzen

Maus ID	Sor-tierung	α/β	V-Region	J-Region	D-Region	CDR3	#
3815	IFN- γ	α	TRAV12-2*02(F)	TRAJ58*01 ORF		CAAETSGSRLTF	1/3
		α	TRAV12-2*02(F)	TRAJ43*01 F		CTVNIDDMRF	1/3
		α	TRAV12-2*02(F)	TRAJ58*01 ORF		CAVEASGSRLTF	1/3
		β	TRVB3-1*01 F	TRBJ2-1*01 F	TRBD2*02 F	CASSHGLAGVYNEQFF	2/2
3825	IFN- γ	α	TRAV22*01 F	TRAJ6*01 F		CAVEPGGSYIPTF	5/5
		β	TRBV27*01 F	TRBJ2-7*01 F	TRBD2*01 F	CASSPGLSYEQYF	4/4
3833	IFN- γ	α	TRAV12-2*02(F)	TRAJ58*01 ORF		CAPETSGSRLTF	6/7
		α	TRAV12-2*02(F)	TRAJ58*01 ORF		CAPETXGSRLTF	1/7
		β	TRVB3-1*01 F	TRBJ2-1*01 F	TRBD2*02 F	CASSQLAGVYNEQFF	4/4
3968	CD137	α	TRAV9-2*02 (F)	TRAJ47*02 (F)		CALRAMEYGNKLVF	4/8
		α	TRAV17*01 F	TRAJ20*01 F		CATDYSNDYKLSF	4/8
		β	TRBV27*01 F	TRBJ2-1*01 F	TRBD2*02 F	CASSPWTSGSFEQFF	2/5

		β	TRBV3-1*01 F	TRBJ2-1*01 F	TRBD2*02 F	CASSQGLAGVYNEQFF	1/5
		β	TRBV18*01 F	TRBJ1-4*01 F	TRBD1*01 F	CASSPSERGNKELFF	1/5
		β	TRBV27*01 F	TRBJ2-3*01 F	TRBD2*01 F	CASSQWTSGPPTTDTQYF	1/5

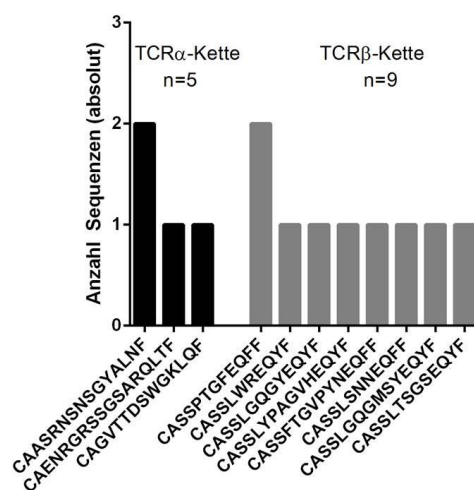
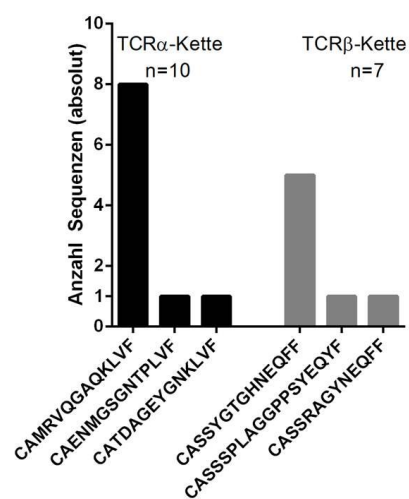
Tabelle III-8: STEAP-TCR-Sequenzen

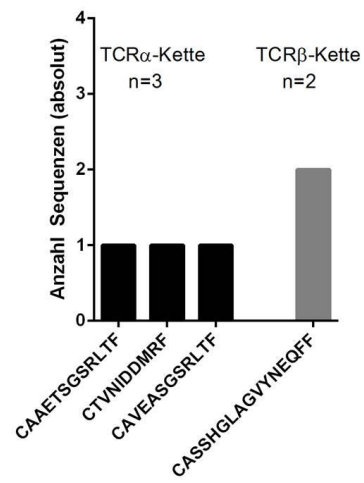
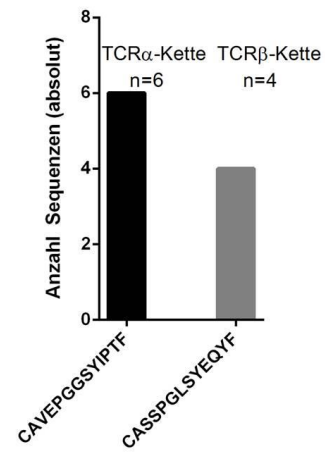
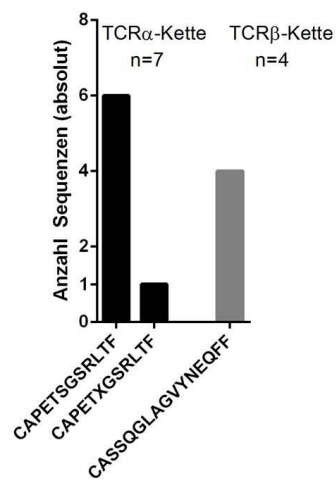
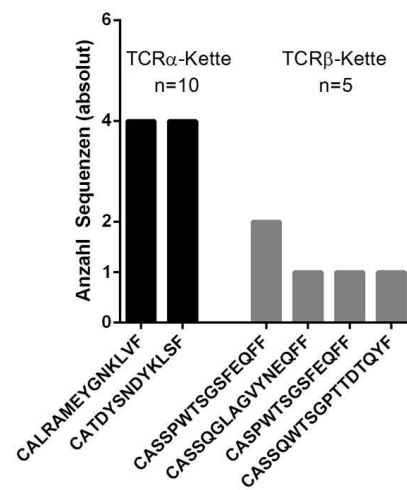
Maus ID	Sortierung	α/β	V-Region	J-Region	D-Region	CDR3	#
3954	IFN- γ	α	TRAV12-3*01 F	TRAJ48*01F		CAMSYPFGNEKLTF	6/11
		α	TRAV12-3*01 F	TRAJ48*01F		CAMSDFGNEKLTF	3/11
		α	TRAV12-3*01 F	TRAJ48*01F		CAMSDFGDEKLTF	1/11
		α	TRAV21*02 (F)	TRAJ18*01 F		CAVKDRGSTLGRLYF	1/11
		β	TRBV27*01 F	TRBJ2-1*01 F	TRBD2*02 F	CASSLSGSSYNEQFF	3/7
		β	TRBV12-4*01 F	TRBJ2-3*01 F	-	CASSLIDTQYF	1/7
		β	TRBV27*01 F	TRBJ2-3*01 F	TRBD2*02 F	CASSSLAGGPDTQYF	1/7
		β	TRBV28*01 F	TRBJ2-3*01 F	TRBD1*01 F	CATPGGAADTQYF	1/7
		β	TRBV27*01 F	TRBJ2-1*01 F	TRBD2*02 F	CASSFGTSGRGEQFF	1/7
3955	IFN- γ	α	TRAV12-3*01 F	TRAJ48*01 F		CAMSDFGNEKLTF	5/10
		α	TRAV26-1*01 F	TRAJ39*01 F		CIVRVGNAGNMLTF	4/10
		α	TRAV26-1*01 F	TRAJ39*01 F		CIVRVGNAGSMLTF	1/10
		β	TRBV21-1*01 P	TRBJ2-1*01 F	TRBD2*02 F	CASSKTLAGVPYNEQFF	2/10
		β	TRBV4-2*01 F	TRBJ2-1*03 F	TRBD2*02 F	CASSQGTGADTQYF	2/10
		β	TRBV27*01 F	TRBJ2-1*01 F	TRBD2*01 F	CASSTSGSSYNEQFF	1/10
3956	CD137	α	TRAV29/DV5*01	TRAJ48*01 F		CAASRANFGNEKLTF	10/11
		α	TRAV20*02 (F)	TRAJ30*01 F		CAVQADGDDKIIF	1/11
		β	TRBV28*01 F	TRBJ2-1*01 F	TRBD2*01 F	CASRSSGVYNEQFF	2/5
		β	TRBV7-9*03 F	TRBJ2-1*01 F	-	CASSLIDYNEQFF	1/5
		β	TRBV12-3*01 F	TRBJ2-1*02 F	TRBD2*01 F	CASRLAGGPTGELFF	1/5
		β	TRBV27*01 F	TRBJ2-1*07 F	-	CASSFAEQYF	1/5
4070	CD137	α	TRAV26-2*01 F	TRAJ30*01 F		CILTNRDDKIIF	1/3
		α	TRAV12-1*01 F	TRAJ20*01 F		CVVNIGDYKLSF	1/3
		α	TRAV13-1*01 F	TRAV13-*01F		CAASIKNTGNQFYF	1/3
		β	TRBV4-1*01 F	TRBJ2-7*01 F	TRBD1*01 F	CASSQDTYYEQYF	2/3
		β	TRBV27*01 F	TRBJ2-1*01 F	TRBD1*01 F	CASSSWTHNEQFF	1/3
4071	CD137	α	TRAV29/DV5*01 F	TRAJ33*01 F		CAATASNYQLIW (PHE 118 nicht ident.)	7/15
		α	TRAV4*01 F	TRAJ21*01 F		CLVGGDNFNKIFYF	7/15
		α	TRAV41*01 F	TRAJ31*01 F		CAVRNNNARLMF	1/15
		β	TRBV28*01 F	TRBJ2-5*01 F	TRBD2*02 F	CASSRLAGEETQYF	3/6
		β	TRBV4-1*01 F	TRBJ2-7*01 F	TRBD2*01 F	CASSQALAGYEQYF	1/6

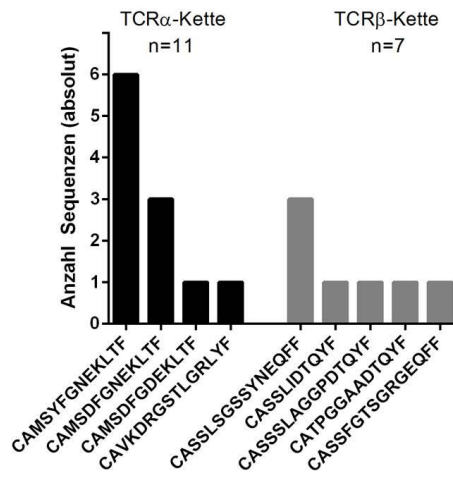
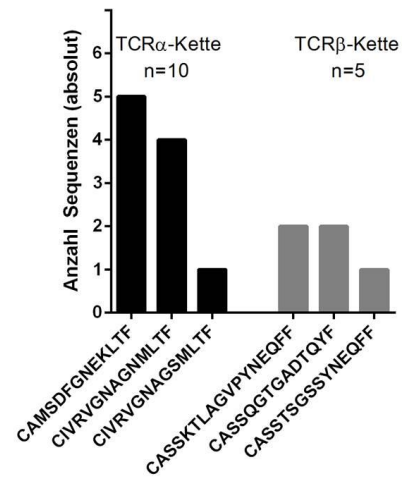
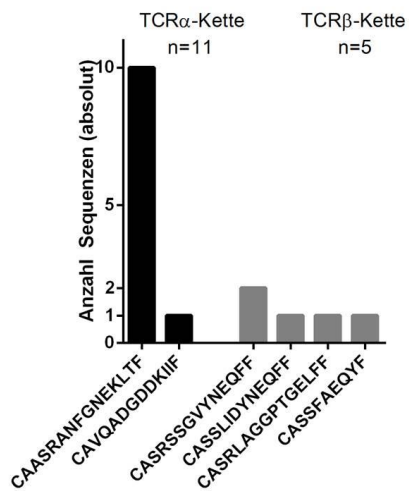
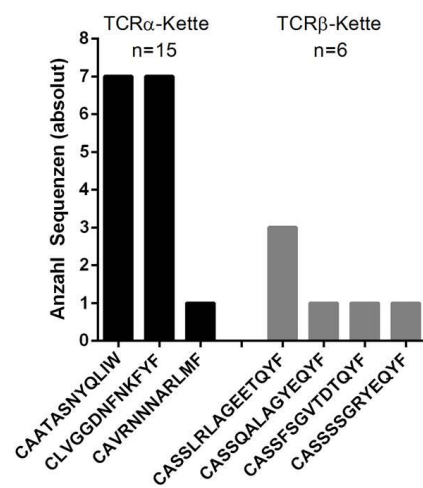
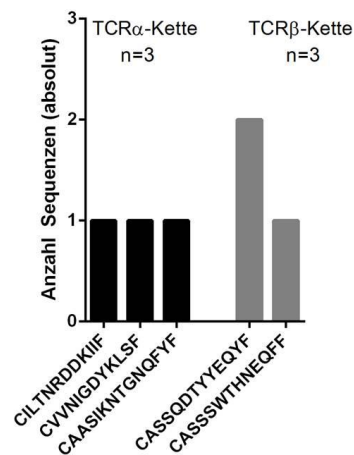
		β	TRBV12-4*01 F	TRBJ2-3*01 F	TRBD2*01 F	CASSFSGVTDQTQYF	1/6
		β	TRBV28*01 F	TRBJ2-7*01 F	TRBD2*02 F	CASSSSGRYEQYF	1/6

Tabelle III-9: PSCA-TCR-Sequenzen

Maus ID	Sortierung	α/β	V-Region	J-Region	D-Region	CDR3	#
5076	IFN- γ	α	TRAV10*01 F	TRAJ9*01 F		CVVRNTGGFKTIF	6/11
		α	TRAV13-1*01 F	TRAJ21*01 F		CAASNPFNKFYF	4/11
		α	TRAV20*02 (F)	TRAJ35*01 ORF		CAVQAIGFGNVLP (PHE118 nicht ident.)	1/11
		β	TRBV12-3*01 F	TRBJ2-1*01 F	TRBD2*02 F	CASSFEAGGDYNEQFF	4/6
		β	TRBV12-3*01 F	TRBJ2-1*01 F	TRBD2*01 F	CASSFLAGTYNEQFF	1/6
		β	TRBV12-3*01 F	TRBJ2-1*01 F	TRBD2*02 F	CASSFAGDTDQYF	1/6

A**PSMA-Maus
ID 3810****PSMA-Maus
ID 3822**

B**PRAME-Maus
ID 3815****PRAME-Maus
ID 3825****PRAME-Maus
ID 3833****PRAME-Maus
ID 3968**

C**STEAP-Maus
ID 3954****STEAP-Maus
ID 3955****STEAP-Maus
ID 3956****STEAP-Maus
ID 4070****STEAP-Maus
ID 4071**

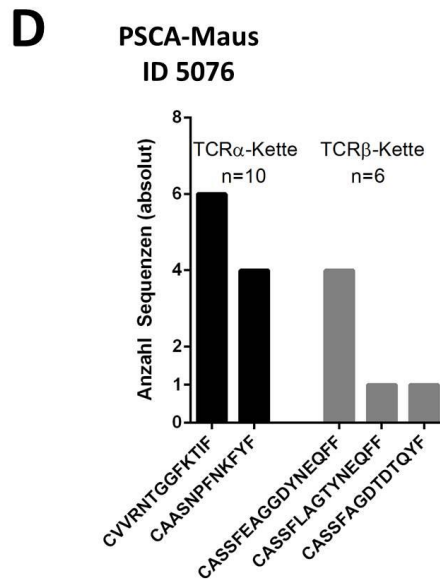


Abbildung III-11: Häufigkeiten isolierter TCR-Sequenzen

Dargestellt sind die aus den einzelnen PSMA- (A), PRAME- (B), STEAP- (C) und PSCA- (D) immunisierten ABAbDII-Mäusen isolierten TCR-Sequenzen (nach der jeweiligen CDR3-Region bezeichnet). „Anzahl Sequenzen“ beziffert, wie oft die TCR-Sequenzen (schwarze Balken: TCRα-Sequenzen; graue Balken: TCRβ-Sequenzen) in der entsprechenden Probe nachgewiesen wurden.

Die Mäuse, bei denen nur je eine dominante TCRα- und eine TCRβ-Kette nachgewiesen werden konnten, sind rot umrandet.

2.4.1 Identifizierung zusammengehöriger TCRα/β-Ketten

Bei zwei der PRAME-immunisierten Mäuse (ID: 3825 und 3833) konnten jeweils nur eine TCRα- und eine TCRβ-Kette identifiziert werden (Abbildung III-11 D), was deren Rekombination zu einem funktionellen TCR nahe legte. Bei der PSMA-immunisierten Maus 3822 konnten ebenfalls nur eine dominante TCRα- und TCRβ-Kette identifiziert werden (Abbildung III-11 A), so dass auch hier die Zusammengehörigkeit der beiden TCR-Ketten eindeutig war. Es konnten zwar auch in den Proben anderer Tiere dominante TCR-Sequenzen nachgewiesen werden, eine eindeutige Zuordnung einer einzigen TCRα-Kette zu nur einer anderen TCRβ-Kette war jedoch nur bei den drei genannten Proben möglich (in Abbildung III-11 rot markiert).

In einem nächsten Schritt musste nun untersucht werden, ob die isolierten TCR α / β -Sequenzen tatsächlich zu einem funktionellen TCR paaren. Die Sequenzen, welche aus der PRAME-immunisierten Maus 3825 isoliert wurden, waren die ersten, bei denen eine eindeutige Zuordnung möglich war. Deshalb war dieser TCR (von nun an TCR-3825) auch der erste, der durch Re-Expression der TCR α / β -Ketten auf seine Funktion hin überprüft wurde.

2.5 Charakterisierung des PRAME-spezifischen TCR-3825

2.5.1 Re-Expression von TCR-3825

Um Re-Expressionsanalysen mit dem potentiell PRAME-spezifischen TCR-3825 durchführen zu können, wurde die in Kapitel II, Abschnitt 2.2.8 beschriebene TCR-Bibliothek zur Generierung der TCR-Vektorkonstrukte verwendet.

Zuerst wurden Codon-optimierte Oligonukleotide, welche für die CDR3-Regionen (und das J-Segment bzw. J/D-Segment) der TCR α / β -Ketten des TCR-3825 kodieren (Kapitel II, Tabelle II-15), kommerziell in Auftrag gegeben. Diese CDR3-Oligonukleotide wurden dann in die Vektoren (pGEM) ligiert, welche bereits die korrekten variablen TCR-Ketten (TRAV22 und TRBV27) enthielten. Mit den erhaltenen Vektorkonstrukten (pAV22-3825-A116-ARE und pBV27-3825-A116-ARE, siehe Kapitel II, Tabelle II-11) wurden elektrisch kompetente *E. coli* transformiert, ausplattiert und vektorhaltige Bakterienkolonien selektiert. Nach anschließender Expansion wurde die Plasmid-DNA isoliert und die im Vektor enthaltenen TCR-Sequenzen mittels Sequenzierung überprüft.

Vektoren mit korrekter TCR-Sequenz konnten dann zur Herstellung *in-vitro*-transkribierter mRNA (*ivt*-RNA) verwendet werden. Durch Elektroporation von Effektorzellen mit der für TCR-3825 kodierenden *ivt*-RNA (jeweils für die TCR α -Kette und für die TCR β -Kette) konnte der TCR nun in verschiedenen Effektorzellen exprimiert werden.

Für alle im Folgenden beschriebenen Versuche, wurden als Effektorzellen PHA-stimulierte PBMC/PBL verwendet, bei denen durch die PHA-Stimulation die CD8⁺ T-Zellen angereichert waren. Für die Elektroporation der Effektoren wurden 30-40 μ g *ivt*-RNA pro Kette eingesetzt. Der jeweilige Anteil CD8- und

TCR-3825-positiver T-Zellen wurde durch Antikörperfärbung und anschließende FACS-Analysen ermittelt. Der TCR konnte durch einen Antikörper angefärbt werden, welcher an die murinisierte C-Region der TCR α - und TCR β -Ketten bindet, und damit von den endogenen TCR der T-Zellen unterschieden werden. Da der Anteil CD8⁺ T-Zellen der PBMC (40-60% CD8⁺ T-Zellen) und die Transfektions-Effizienz von vielen Faktoren abhängig und somit nie konstant waren, wurde dies bei jedem Versuch ermittelt und angegeben (siehe Abbildung III-12)

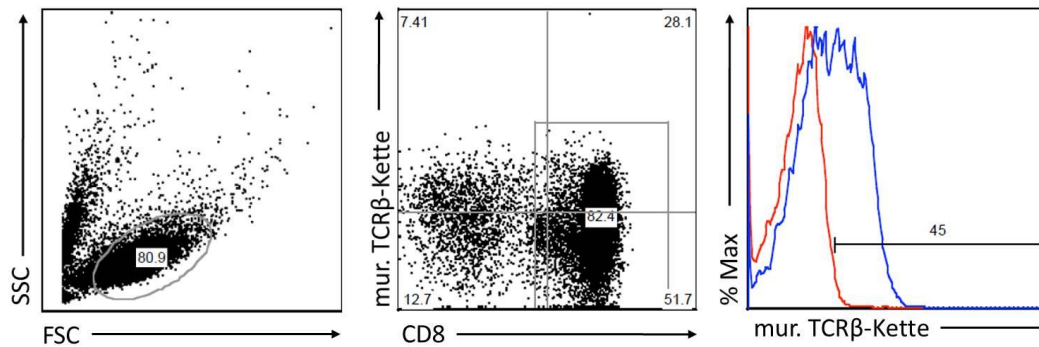


Abbildung III-12: FACS-Analyse TCR-3825-elektroporierter PBMC

Exemplarische Darstellung der FACS-Analyse zur Ermittlung TCR⁺/CD8⁺ T-Zellen nach Elektroporation von PBMC mit für den TCR kodierender *ivt*-RNA. Als Negativkontrolle wurden H₂O-transfizierte PBMC parallel gefärbt. Die Zellen wurden mit einem CD8-spezifischen und einem für die murine TCR β -Kette des transfizierten TCR spezifischen Antikörper gefärbt. Zuerst wurden die Gesamt-PBMC betrachtet und die Lymphozyten-Population wurde identifiziert (linker Blot). Anschließend wurde die Lymphozytenpopulation bezüglich ihrer CD8- und TCR-Expression dargestellt (mittlerer Blot). Um den Anteil TCR-positiver Zellen, anteilig an den CD8-positiven Zellen (82,4%) darzustellen, wurden die CD8-positiven Zellen selektiv betrachtet (rechter Blot, blauer Graph). Durch gleichzeitige Darstellung der Negativkontrolle (roter Graph), konnte der Anteil TCR-exprimierender Zellen ermittelt werden (hier exprimieren 45% der CD8-positiven T-Zellen den transfizierten TCR-3825). Wurden für eine Kokultur also 1×10^5 transfizierte PBMC eingesetzt, bei einem Anteil von 82,4% CD8⁺ T-Zellen ($0,824 \times 10^5$), so waren insgesamt 37×10^4 TCR⁺/CD8⁺ T-Zellen enthalten.

2.5.2 Bestätigung der Funktionalität von TCR-3825

Um zu überprüfen, ob die isolierten TCR α / β -Ketten von TCR-3825 tatsächlich zusammengehören und zu einem funktionellen TCR paaren, wurden die

Effektorzellen mit der für den Rezeptor kodierenden *ivt*-RNA transfiziert und mit verschiedenen Zielzellen kokultiviert. Als Negativkontrolle wurden mit H₂O elektroporierte Effektorzellen parallel mit den gleichen Zielzellen kokultiviert (Daten nicht gezeigt). Nach 24-stündiger Kokultur wurden die Überstände abgenommen und der Gehalt an IFN- γ in den Überständen mittels IFN- γ -ELISA gemessen (Abbildung III-13). Als Zielzellen wurden zum einen Mel624.38 und K562-A2 verwendet, welche beide sowohl das Antigen (PRAME) exprimieren, als auch das restringierende MHC-Klasse-I-Molekül (HLA-A2). Sowohl die solide Tumorzelllinie Mel624.38 als auch die hämatopoetische Zelllinie K562-A2 wurde von den TCR-3825-exprimierenden Effektorzellen erkannt. K562-Zellen, welche zwar das Antigen, nicht jedoch HLA-A2 exprimierten, wurden nicht erkannt. Ebenso wurden auch HLA-A2-positive, PRAME-negative DSaDS-Zellen nicht erkannt.

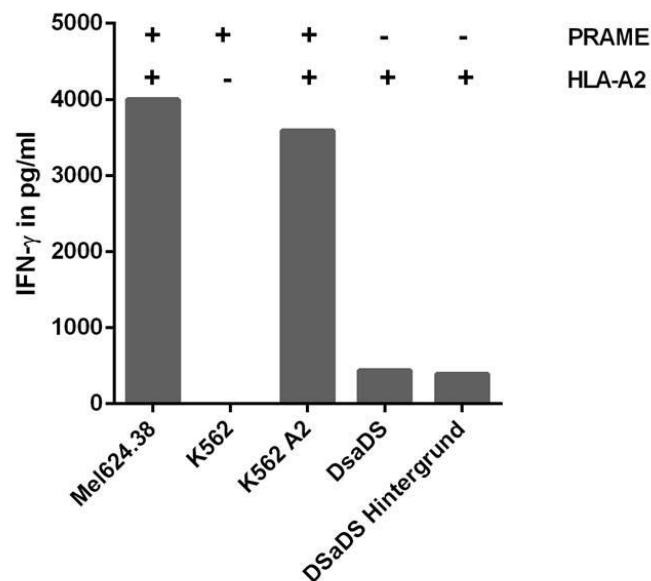


Abbildung III-13: Testung von TCR-3825 auf Funktion und Restriktion

Dargestellt sind die im IFN- γ -ELISA gemessenen Zytikonkonzentrationen nach 24-stündiger Kokultur. Als Zielzellen wurden Mel624.38, K562, K562-A2 und DSaDS verwendet (PRAME-Expression und HLA-A2-Expression jeweils angegeben). Als Effektoren wurden CD8-angereicherte PBMC verwendet, welche entweder mit TCR-3825 oder H₂O (Daten nicht gezeigt) transfiziert wurden. Es wurden $1,5 \times 10^4$ TCR⁺/CD8⁺ Effektorzellen mit 1×10^5 Zielzellen kokultiviert. „DSaDS Hintergrund“ bezieht die IFN- γ -Konzentration im Überstand der DSaDS-Zellen (ohne Effektoren).

Dieser erste Test hatte somit gezeigt, dass die aus Maus 3825 isolierten TCR-Ketten tatsächlich zu einem funktionellen TCR paaren und eine PRAME-assoziierte Erkennung vermitteln (IFN- γ -Sekretion durch die TCR-3825-elektroporierten Effektoren, nicht jedoch durch die H₂O-elektroporierten Effektoren). Zudem scheint die Erkennung des Antigens von der zusätzlichen Expression von HLA-A2 abzuhängen (HLA-A2-negative K562 wurden nicht erkannt). Eine Expression des Restriktionselementes ohne gleichzeitige Expression des Antigens (DSaDS) reichte ebenfalls nicht für eine Erkennung. Der Rezeptor TCR-3825 scheint also eine PRAME-assoziierte, HLA-A2 restringierte Funktion zu vermitteln.

2.5.3 Peptid-Spezifität und -Affinität von TCR-3825

Um die Peptid-Spezifität des TCR-3825 zu untersuchen bzw. zu bestätigen, wurde die Erkennung des für die Immunisierung von Maus 3825 verwendeten PRAME-Peptids SLLQHLIGL (SLL-Peptid) untersucht. Dazu wurde die TAP-defiziente, HLA-A2-positive Zelllinie T2 mit verschiedenen Konzentrationen (10^{-5} M bis 10^{-10} M) des SLL-Peptides extern beladen. Durch Cokultivierung mit TCR-3825-exprimierenden Effektorzellen und anschließende IFN- γ -Messung der Überstände konnten sowohl die Spezifität als auch die Affinität des TCR-3825 untersucht werden (Abbildung III-14).

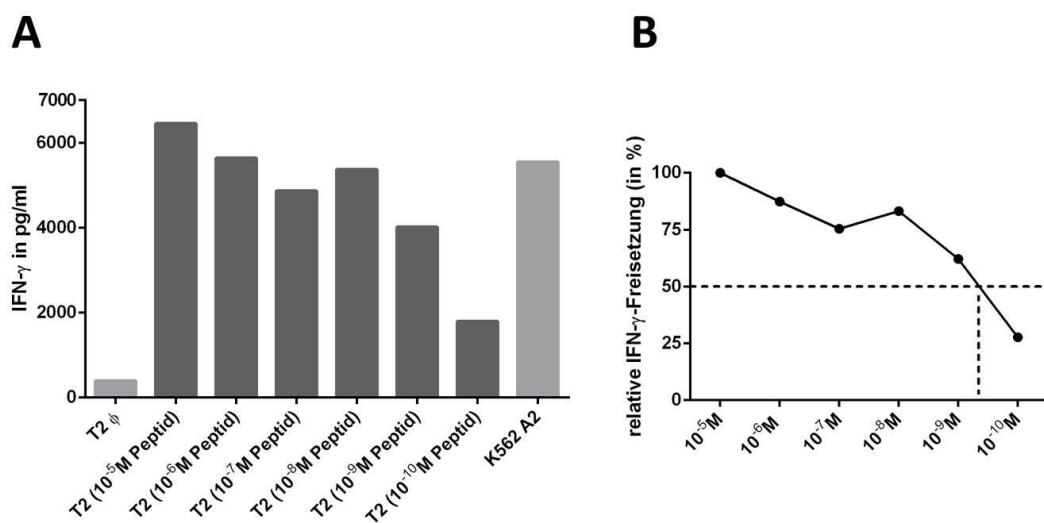


Abbildung III-14: Spezifität und Affinität von TCR-3825

Gezeigt sind die nach 24-stündiger Kokultur in den Überständen mittels IFN- γ -ELISA gemessenen Zytokinkonzentrationen (**A** und **B**). Als Zielzellen dienten mit verschiedenen Peptidkonzentrationen (10^{-5} M bis 10^{-10} M) beladene und unbeladene (Negativkontrolle, T2 ϕ), HLA-A2-positive T2-Zellen. Als Effektoren wurden TCR-3825-transfizierte und H₂O-transfizierte (Daten nicht gezeigt) PBMC verwendet. Es wurden $1,4 \times 10^4$ TCR⁺/CD8⁺-Effektoren mit 2×10^4 Zielzellen inkubiert. Als Positivkontrolle dienten K562 A2-Zellen (PRAME⁺ / HLA-A2⁺). In **B** ist die halbmaximale IFN- γ -Konzentration von 3226,75pg/ml eingezeichnet (gepunktete Linie).

Bei diesem Versuch zeigte sich eine peptidabhängige Erkennung der T2-Zellen. Nur die mit dem SLL-Peptid beladenen T2 konnten eine IFN- γ -Sekretion der Effektorzellen induzieren, nicht jedoch die T2-Zellen, die das Peptid nicht präsentierten (T2 ϕ). Es hat sich gezeigt, dass mit abnehmender Peptidkonzentration auch die Erkennung durch die TCR-3825-exprimierenden T-Zellen abnimmt, dass aber selbst bei einer Peptidkonzentration von 10^{-10} M noch eine deutliche Erkennung stattfand, was durch eine IFN- γ -Sekretion von 1700pg/ml verdeutlicht wird. Wie in Abbildung III-14 B gezeigt, liegt die halbmaximale IFN- γ -Sekretion bei einer Peptidkonzentration zwischen 10^{-9} M und 10^{-10} M. Somit konnte gezeigt werden, dass der aus der mit dem SLL-Peptid immunisierten Maus 3825 isolierte T-Zell-Rezeptor dasselbe Peptid erkennt, gegen welches er ursprünglich induziert wurde. Zusätzlich scheint es sich mit einer halbmaximalen IFN- γ -Sekretion bei einer Peptidkonzentration zwischen 10^{-9} M und 10^{-10} M um einen stark affinen T-Zell-Rezeptor zu handeln.

2.5.4 Erkennung des PRAME-Antigens durch TCR-3825

Wie in Abschnitt 2.5.2 beschrieben, konnte bereits eine PRAME-assoziierte Erkennung durch den TCR-3825 gezeigt werden, und wie in Abschnitt 2.5.3 gezeigt, konnte das SLL-Peptid als das von TCR-3825 erkannte Epitop identifiziert werden. Nun sollte gezeigt werden, dass die Erkennung durch TCR-3825 tatsächlich PRAME-spezifisch ist, und dass das SLL-Epitop auch wirklich

natürlicherweise prozessiert und präsentiert wird. Daher wurden zunächst HLA-A2-positive, PRAME-negative mLCL mit für das PRAME-Antigen kodierender *ivt*-RNA transfiziert und mit TCR-3825-exprimierenden Effektorzellen kokultiviert. Als Negativkontrollen wurden eGFP-elektroporierte mLCL ME und H₂O-elektroporierte PBMC verwendet. Zusätzlich wurden PBMC von zwei verschiedenen Spendern verwendet (PBMC KJ und PBMC ME). Die nach Kokultivierung im Überstand gemessenen IFN- γ -Konzentrationen sind in Abbildung II-15 A gezeigt.

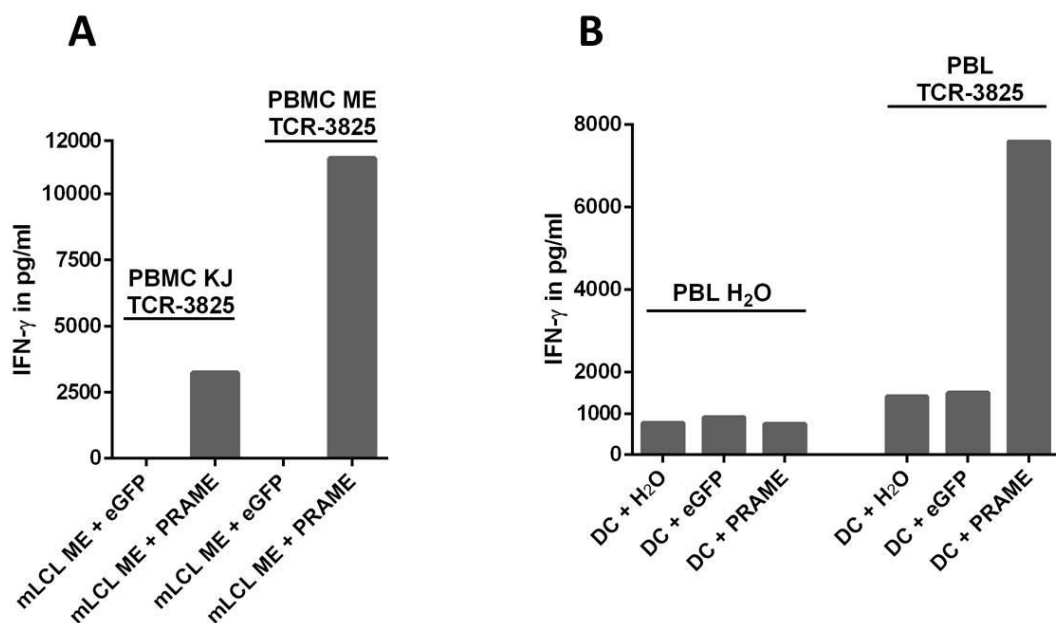


Abbildung III-15: PRAME-spezifische Erkennung von Zielzellen durch TCR-3825-transfizierte Effektorzellen

A: gezeigt sind die nach 24-stündiger Kokultur im Überstand mittels IFN- γ -ELISA gemessenen Zytokinkonzentrationen. Als Zielzellen wurden je $1,75 \times 10^4$ PRAME⁺ (durch Antikörperfärbung und anschließende FACS-Analyse ermittelt) mLCL ME bzw. 73% eGFP⁺ mLCL ME (durch FACS-Analysen ermittelt) verwendet und mit $2,5 \times 10^4$ TCR-3825⁺/CD8⁺ Effektorzellen (PBMC KJ und PBMC ME) inkubiert.

B: gezeigt sind die nach 24-stündiger Kokultur im Überstand mittels IFN- γ -ELISA gemessenen Zytokinkonzentrationen. Als Zielzellen wurden je 1×10^5 3d mDC verwendet, welche entweder mit H₂O, eGFP oder dem PRAME-Antigen transfiziert wurden. Eine genaue Kalkulation des Anteils PRAME-positiver DCs mittels Antikörperfärbung war aufgrund der endogenen PRAME-Expression durch die DC nicht möglich. Die Kokultur erfolgte mit $1,2 \times 10^4$ autologen, TCR-3825⁺/CD8⁺ T-Zellen.

Dabei hat sich gezeigt, dass nur die mit dem PRAME-Antigen transfizierten mLCL ME von den TCR-3825-exprimierenden Effektorzellen beider Spender erkannt werden. Durch die das irrelevante eGFP-Antigen exprimierenden mLCL ME konnte keine IFN- γ -Produktion der Effektorzellen induziert werden. Im Überstand der mit den H₂O-elektroporierten Effektorzellen inkubierten Zielzellen wurde kein IFN- γ gemessen (Daten nicht gezeigt). Somit konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass nur Zielzellen, welche das Antigen PRAME exprimieren, von dem TCR-3825 erkannt werden. Diese Erkennung setzt voraus, dass das SLL- Peptid von den mLCL prozessiert und als Epitop präsentiert wird. Dendritische Zellen sind die wichtigsten, Antigen-präsentierenden Zellen des menschlichen Immunsystems. Daher sollte untersucht werden, ob DC das PRAME-Antigen in gleicher Weise prozessieren und präsentieren, und somit PRAME-spezifische T-Zellen stimulieren können. Hierzu wurden Dendritische Zellen generiert und mit PRAME-*ivt*-RNA transfiziert, als Negativkontrolle wurden H₂O- und eGFP-transfizierte DCs verwendet. Die Cokultur erfolgte mit autologen, TCR-3825- oder H₂O-transfizierten PBL. Nach 24-stündiger Cokultur wurden die IFN- γ -Konzentrationen in den Überständen gemessen (Abbildung III-15 B).

Dabei hat sich gezeigt, dass die DC auch in Cokultur mit den H₂O-elektroporierten PBL bereits zu einem Hintergrund von bis zu 900pg/ml führen. Dies ist aufgrund der effizienten Antigen-Präsentation dieser Zellen in Cokultur mit PBL, welche natürlich auch über endogene T-Zell-Rezeptoren unbekannter Spezifität verfügen, durchaus zu erwarten. Die erhöhten IFN- γ -Werte, die nach Cokultur der TCR-3825-transfizierten Effektorzellen mit den Negativkontrollen (DC+H₂O und DC+eGFP) gemessen wurden, erklären sich durch die endogene Expression des PRAME-Antigens der DC (nachgewiesen mittels PCR, Daten nicht gezeigt). Trotz des hohen Hintergrundes, konnte die spezifische Erkennung der PRAME-transfizierten DC durch die TCR-3825-exprimierenden T-Zellen anhand eines IFN- γ -Wertes von 7500pg/ml jedoch deutlich gezeigt werden. Die Prozessierung des PRAME-Antigens durch Dendritische Zellen führte also ebenfalls zur Präsentation des SLL-Peptides und somit zur Stimulation TCR-3825-transfizierter T-Zellen.

2.5.5 Spezifische Lyse PRAME-exprimierender Zielzellen durch TCR-3825

Es konnte zwar bereits gezeigt werden, dass der TCR-3825 eine Antigen-spezifische Stimulation TCR-3825-exprimierender T-Zellen vermittelt. Nun sollte jedoch untersucht werden, ob der TCR-3825 auch zu einer T-Zell-vermittelten, spezifischen Lyse PRAME-exprimierender Zielzellen führt. Als Zytotoxizitätstest wurde ein $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstest durchgeführt. Wie in Kapitel II, Abschnitt 2.3.2, beschrieben, wurden die Zielzellen mit radioaktivem $^{51}\text{Chrom}$ markiert. Als Zielzellen wurden K562, K562-A2 und T2-Zellen verwendet. Die T2-Zellen wurden entweder unbeladen ($\text{T2}\phi$), mit dem SLL-Peptid beladen oder mit einem irrelevanten, aber PRAME-assoziierten Peptid (ALY-Peptid: ALYVDSLFFL) beladen und eingesetzt. Als Effektorzellen wurden TCR-3825-transfizierte oder mit H_2O elektroporierte PBMC eingesetzt. Die nach Kokultur durch die Zielzellen in die Überstände freigesetzten Mengen an $^{51}\text{Chrom}$ wurden gemessen. Die anhand dieser Werte ermittelten Anteile lysierter Zielzellen sind in Abbildung III-16 dargestellt.

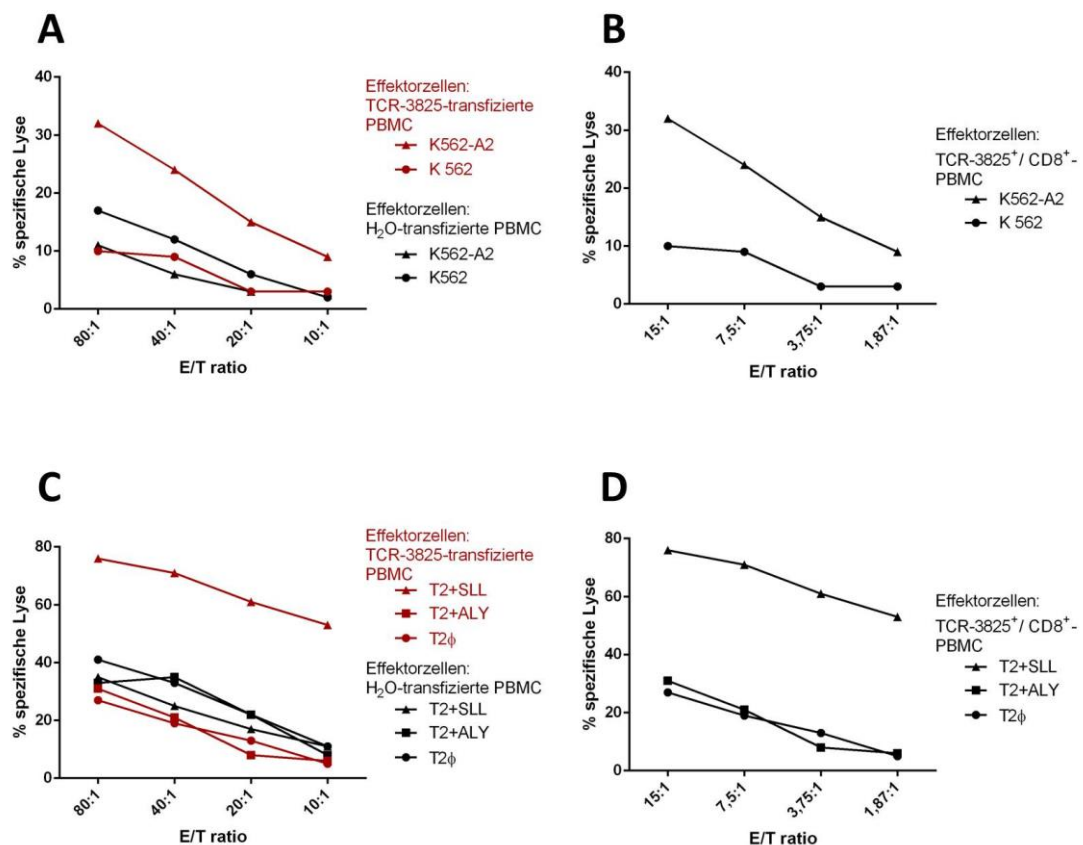


Abbildung III-16: Bestimmung der TCR-3825-vermittelten spezifischen Lyse verschiedener Zielzellen mittels Chrom-Freisetzungs-Test

Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Zielzellen, der bei verschiedenen E/T-Verhältnissen (80:1 bis 10:1 bzw. 15:1 bis 1,87:1) spezifisch lysiert wurde (angegeben in % spezifische Lyse). Zur Berechnung der % spezifische Lyse wurde die in Kapitel II, Abschnitt 2.3.2 angegebene Formel verwendet.

A: Dargestellt ist der prozentuale Anteil an K562 (PRAME⁺ / HLA-A2⁻) und K562-A2 (PRAME⁺ / HLA-A2⁺), der nach Cokultur mit verschiedenen Mengen TCR-3825-transfizierter PBMC (rote Kurven) bzw. H₂O-transfizierter PBMC (schwarze Kurven) ermittelt wurde. Es wurden je 2000 Zielzellen eingesetzt.

B: Gezeigt ist der prozentuale Anteil spezifisch lysierter Zielzellen (K562 und K562-A2) durch verschiedene Mengen TCR-3825-transfizierte PBMC, wobei der durch FACS-Analysen (Daten nicht gezeigt) ermittelte Anteil TCR-3825-positiver, CD8-positiver T-Zellen beim Verhältnis E/T angegeben ist.

C: Dargestellt ist der prozentuale Anteil an T2-Zellen (HLA-A2⁺), der nach Cokultur mit verschiedenen Mengen TCR-3825-transfizierter PBMC (rote Kurven) bzw. H₂O-transfizierter PBMC (schwarze Kurven) ermittelt wurden. Die T2-Zellen wurden entweder unbeladen (T2 ϕ), mit dem SLL-Peptid beladen oder mit einem irrelevanten PRAME-assoziierten Peptid (ALY-Peptid) beladen für die Cokultur eingesetzt. Es wurden je 2000 Zielzellen eingesetzt.

D: Gezeigt ist der prozentuale Anteil spezifisch lysierter Zielzellen (T2 ϕ , T2-SLL und T2-ALY) durch TCR-3825-transfizierte PBMC, wobei der durch FACS-Analysen (Daten nicht gezeigt) ermittelte Anteil TCR-3825-positiver, CD8-positiver T-Zellen beim Verhältnis E/T angegeben ist.

Wie in Abbildung III-16 A zu sehen, wurden K562-A2 von TCR-3825-exprimierenden PBMC deutlich besser erkannt und lysiert (32% Lyse bei einem E/T-Verhältnis von 80:1) als HLA-A2-negative K562-Zellen (10% Lyse bei einem E/T-Verhältnis von 80:1). Die als Negativkontrolle verwendeten, mit H₂O elektroporierten Effektorzellen zeigten eine spezifische Lyse der beiden Zelllinien, welche bei einem E/T-Verhältnis von 80:1 bei 10-15% lag, so dass diese Werte wohl als PBMC-vermittelter Hintergrund betrachtet werden können. Ein durch die Titration der Effektorzellen bedingter und auch erwarteter Abfall der spezifischen Lyse (weniger lysierte Zielzellen bei weniger eingesetzten Effektorzellen) konnte beobachtet werden. In Abbildung III-16 B ist gezeigt (bei Berechnung der tatsächlich eingesetzten TCR-3825⁺ / CD8⁺ T-Zellen aus den gesamten TCR-3825-transfizierten PBMC), dass selbst bei sehr geringem E/T-Verhältnis noch eine spezifische Lyse der Zielzellen erfolgte.

Wie in Abbildung III-16 C dargestellt, wurden außerdem nur T2 Zellen, welche mit dem SLL-Peptid beladen waren, von TCR-3825-exprimierenden PBMC

spezifisch erkannt und lysiert (76% Lyse bei einem E/T-Verhältnis von 80:1 im Vergleich zu 27% (T2 ϕ) bzw. 31% (T2-ALY) spezifischer Lyse der als Negativkontrolle dienenden Zielzellen). Der durch die Effektor-Titration erwartete Abfall an % spezifischer Lyse konnte auch hier beobachtet werden. Für die H₂O-elektroporierten Effektorzellen wurde eine Lyse der Zielzellen ermittelt, die bei einem E/T-Verhältnis von 80:1 zwischen 30-40% lag, weshalb der PBMC-vermittelte Hintergrund im Bereich dieser Werte anzusiedeln ist. Bei Berechnung der tatsächlich TCR-3825-positiven, CD8-positiven T-Zellen (anteilig an den gesamten, TCR-transfizierten PBMC), zeigte sich auch hier die starke zytotoxische Kapazität des TCR-3825. Selbst bei sehr kleinem E/T-Verhältnis (E/T-Verhältnis von 1,87:1) erfolgt noch eine deutliche Lyse (53%) der SLL-Peptid-präsentierenden T2 Zellen.

Durch den Chrom-Freisetzung-Test wurde also nachgewiesen, dass TCR-3825-exprimierende T-Zellen sowohl PRAME-exprimierende Tumorzellen, als auch mit dem SLL-Peptid beladene T2 Zellen spezifisch erkennen und deutlich über Hintergrund-Niveau lysieren.

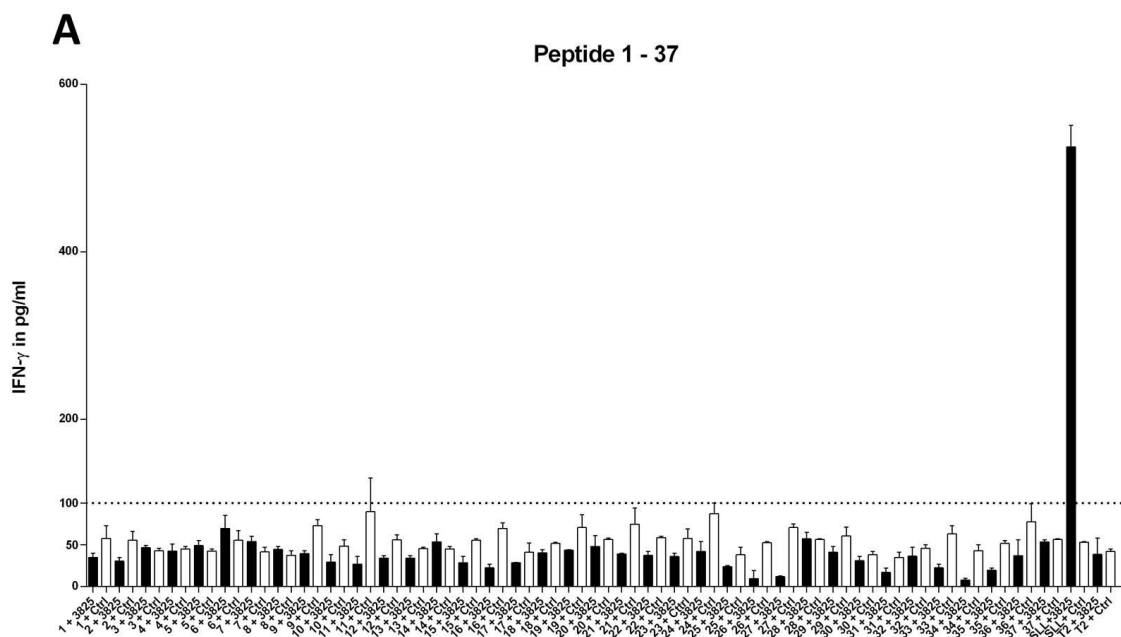
Der T-Zell-Rezeptor 3825 vermittelte also nicht nur eine Erkennung und Stimulation der TCR-positiven T-Zellen (wie durch die IFN- γ -Sekretion nach Antigenerkennung gezeigt werden konnte), sondern auch die zytotoxische Funktion der T-Zellen.

2.5.6 Spezifitäts-Testung des T-Zell-Rezeptors 3825 mit Hilfe einer HLA-A2-Selbstpeptid-Bibliothek

Zur Evaluierung der Spezifität von T-Zell-Rezeptoren, wurde im Rahmen des SFB TR-36 durch eine Kooperation der Arbeitsgruppen von Prof. Wolfgang Uckert (Institut für Molekulare Medizin, MDC Berlin) und der Arbeitsgruppe von Prof. Dolores Schendel eine HLA-A2-Selbstpeptid-Bibliothek entwickelt (Sommermeyer et al., 2013). Dabei handelt es sich um eine Peptid-Bibliothek, welche die am häufigsten, von humanen HLA-A2-Molekülen präsentierten Selbstpeptide umfasst. Diese Peptide wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Stefan Stevanovic (Tübingen) identifiziert. Die Peptidbibliothek umfasst 120 dieser häufig präsentierten Selbstpeptide (aufgelistet

im Anhang in Tabelle II-17), mit welchen, nach Beladung Antigen-präsentierender Zellen, die Spezifität und/oder Kreuzreaktivität eines T-Zell-Rezeptors untersucht werden kann. Diese HLA-A2-Selbstpeptidbibliothek erhebt keinerlei Anspruch auf Vollständigkeit. Nichtsdestotrotz ermöglicht sie, die Kreuzreaktivität eines TCR mit einem dieser häufig präsentierten Selbstpeptide zu erkennen bzw. auszuschließen. Im Falle einer Erkennung dieser Selbstpeptide durch einen zu testenden TCR, wäre dies ein klares Ausschlußkriterium für diesen TCR als Kandidat für den adoptiven T-Zell-Transfer.

Für die hier durchgeführten Versuche zur Spezifitätstestung des TCR-3825 wurden T2 Zellen mit den Peptiden (10^{-5} M) beladen. Als Positivkontrolle wurden mit dem SLL-Peptid beladene T2 Zellen, als Negativkontrolle wurden unbeladene T2 Zellen (T2 ϕ) verwendet. Die nach Cokultur mit TCR-3825-transfizierten bzw. H₂O-transfizierten PBMC in den Überständen gemessenen IFN- γ -Konzentrationen sind in Abbildung III-17 dargestellt. Die nach Cokultivierung der Peptid-beladenen T2 Zellen mit den TCR-transfizierten PBMC gemessenen Zytokinkonzentrationen (in pg/ml; schwarze Balken) sind jeweils neben der Negativkontrolle (Peptid-beladene T2 Zellen, cokultiviert mit H₂O-transfizierten PBMC; weiße Balken) aufgeführt.



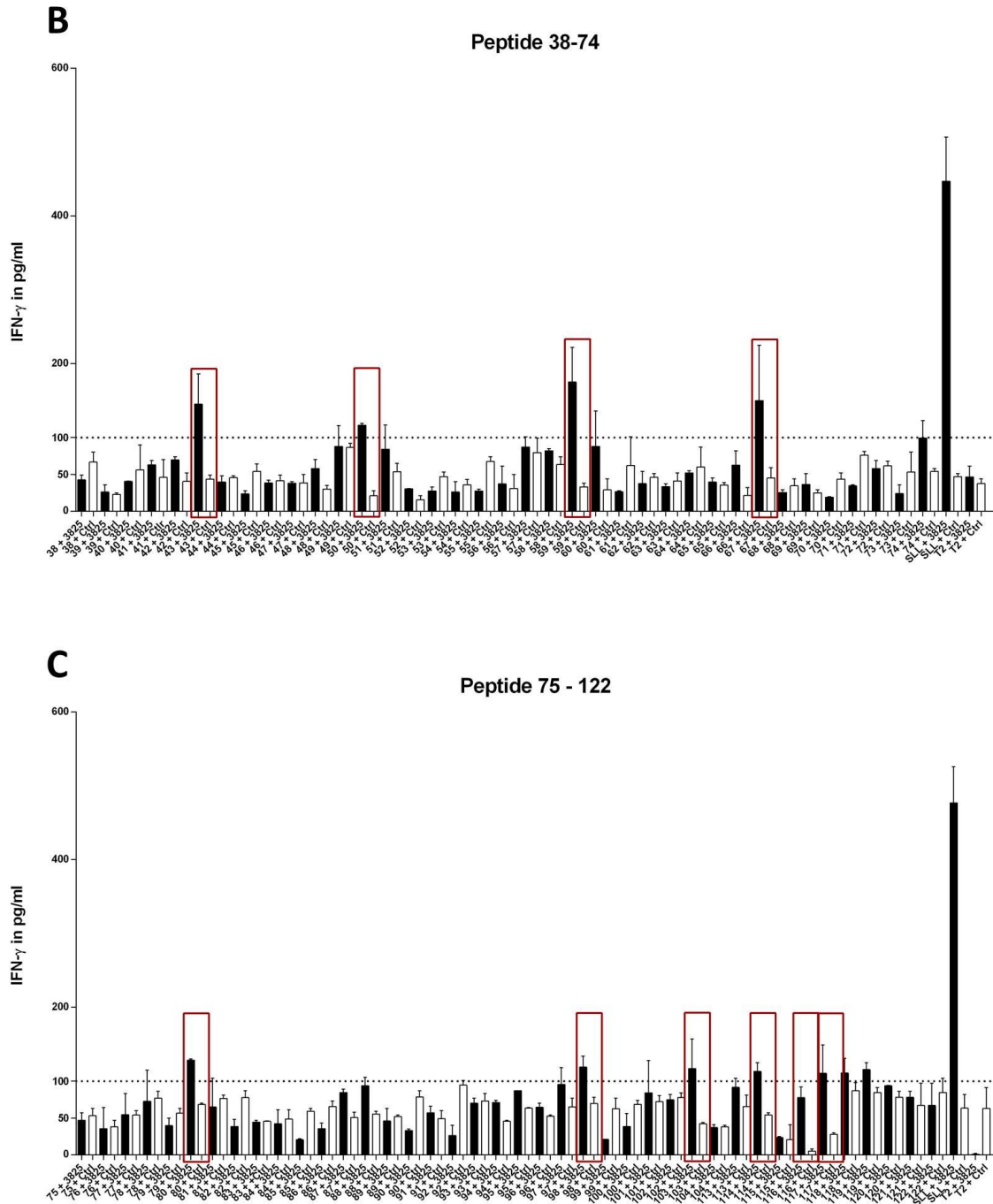


Abbildung III-17: Testung des TCR-3825 auf Kreuzreaktivität mit Peptiden einer HLA-A2-Selbstpeptidbibliothek

Gezeigt sind die mittels IFN- γ -ELISA gemessenen Zytokinkonzentrationen in den Überständen der Kokulturen. Angegeben sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung. Als Zielzellen wurden T2 Zellen (HLA-A2⁺) verwendet, welche mit den Peptiden der HLA-A2-Selbstpeptid-Bibliothek (Peptidkonzentration: 10^{-5} M; Peptid-ID jeweils angegeben, siehe Tabelle II-17 im Anhang; **A**: Peptide 1-37; **B**: Peptide 38-74; **C**: Peptide 75-122) beladen wurden. Als Negativkontrolle dienten unbeladene T2 Zellen (T2 ϕ), als Positivkontrolle wurden T2 Zellen mit dem SLL-Peptid beladen. Als Effektorzellen wurden TCR-

3825-transfizierte PBMC (schwarze Balken) bzw. H₂O-transfizierte PBMC (weiße Balken) eingesetzt. Alle Werte unter 100pg/ml (gepunktete Linie) wurden als Hintergrund betrachtet. Rot markiert sind diejenigen Peptide, deren mittlere IFN- γ -Werte über 100pg/ml liegen.

In den Überständen der mit den H₂O-transfizierten PBMC (Negativkontrollen) angesetzten Cokulturen wurden z.T. Zytokinkonzentrationen von bis zu 100pg/ml gemessen, weshalb Werte bis 100pg/ml (gepunktete Linie) als Hintergrund betrachtet wurden. Wurden in den Überständen der mit den TCR-3825-transfizierten Effektorzellen angesetzten Cokulturen IFN- γ -Konzentrationen über 100pg/ml gemessen, und fiel dabei die Negativkontrolle für dieses Peptid deutlich geringer aus (rot markiert), so wurden diese Peptide als „verdächtig-kreuzreaktiv“ eingestuft, vor allem da die Positivkontrolle (mit dem SLL-Peptid beladene T2 Zellen, kokultiviert mit TCR-3825-transfizierten PBMC) lediglich bei etwa 500pg/ml lag.

Als „verdächtig-kreuzreaktiv“ eingestuft wurden daher die Peptide 43, 50, 59, 67, 80, 98, 103, 114, 116 und 117, obwohl es keinerlei Ähnlichkeiten mit der Peptidsequenz des von TCR-3825 erkannten Epitopes SLLQHLIGL gab (Vgl. Tabelle II-17 im Anhang). Die genannten Peptide wurden daher nochmals getestet, als Negativkontrollen wurden die Peptide 120, 121 und 122 und unbeladene T2 Zellen verwendet, die Ergebnisse sind in Abbildung III-18 gezeigt.

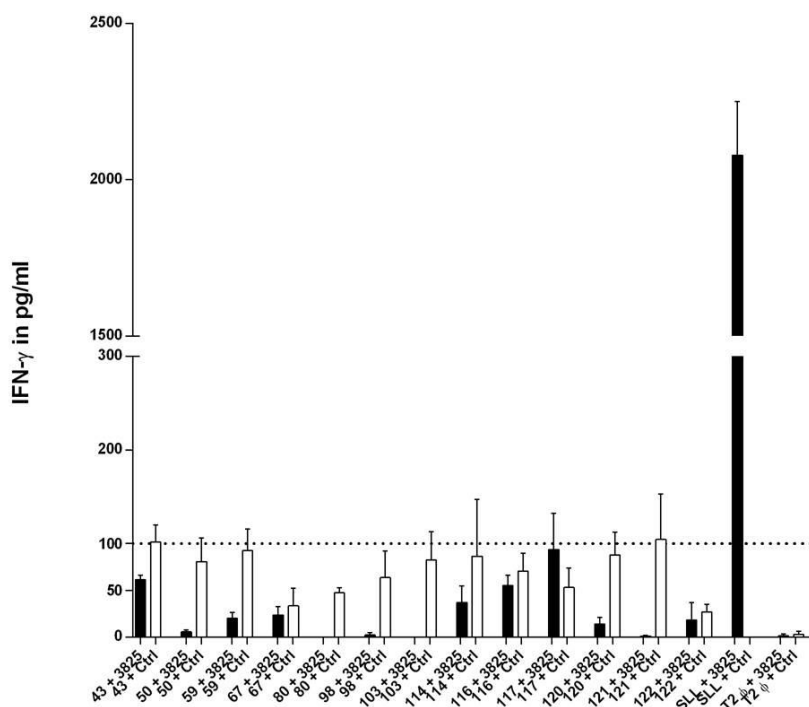


Abbildung III-18: Wiederholte Testung des TCR-3825 auf Kreuzreaktivität mit ausgewählten Peptiden einer HLA-A2-Selbstpeptidbibliothek

Gezeigt sind die mittels IFN- γ -ELISA gemessenen Zytokinkonzentrationen in den Überständen der Cokulturen. Angegeben sind die Mittelwerte (Balken), und deren Standardabweichung. Als Zielzellen wurden T2 Zellen (HLA-A2⁺) verwendet, welche mit den Peptiden der HLA-A2-Selbstpeptid-Bibliothek (Peptidkonzentration: 10⁻⁵M; Peptid-ID jeweils angegeben, siehe Tabelle II-17 im Anhang) beladen wurden. Als Negativkontrolle dienten unbeladene T2 Zellen (T2 ϕ), als Positivkontrolle wurden T2 Zellen mit dem SLL-Peptid beladen. Als Effektorzellen wurden TCR-3825-transfizierte PBMC (schwarze Balken) bzw. H₂O-transfizierte PBMC (weiße Balken) eingesetzt. Die gepunktete Linie markiert den Wert von 100pg/ml.

Bei dieser wiederholten Testung der auffälligen Peptide, hat sich eine mögliche Kreuzreaktivität des TCR-3825 nicht bestätigt. Alleine in den Überständen der mit Peptid 117 beladenen T2 Zellen wurde nach Cokultur mit TCR-transfizierten PBMC im Vergleich zur Negativkontrolle (Cokultur mit H₂O-transfizierten PBMC) mehr IFN- γ gemessen (41pg/ml). Dies entspricht jedoch nur 1/50 der IFN- γ -Konzentration, die in den Überständen der mit dem SLL-Peptid beladenen T2 Zellen nach Cokultur mit TCR-3825-transfizierten PBMC gemessen wurde (2079pg/ml).

Somit wurden keine der in der HLA-A2-Selbstpeptid-Bibliothek enthaltenen Peptide durch den T-Zell-Rezeptor 3825 erkannt.

2.5.7 Kreuzreaktivität des TCR-3825 mit einem dem SLL-Epitop ähnlichen Selbstpeptid

Um die Spezifität des T-Zell-Rezeptors 3825 noch genauer zu untersuchen, wurde die Erkennung, dem SLL-Epitop ähnlicher Peptide, durch TCR-3825 untersucht.

Zur Identifizierung solcher Peptide wurde die sog. „Expitope“-Datenbank verwendet (<http://webclu.bio.wzw.tum.de/expitope/>). Diese Datenbank nutzt bereits publizierte Daten für Normal- und Tumorgewebe verschiedener Organe (Herz, Leber, Nieren, Gehirn, Haut) um Proteine mit zugehörigen Peptidsequenzen zu identifizieren, die potenzielle TCR-Epitope darstellen können. Zum anderen liefert die Datenbank auch Informationen, zu dem untersuchten Epitop sehr ähnlichen Peptiden (mit Abweichungen bis zu 50% der

Original-Sequenz), welche möglicherweise von einem TCR kreuzreaktiv erkannt werden können.

Die Expitope-Datenbank hat bestätigt, dass das SLL-Peptid tatsächlich nur in der Proteinsequenz des Antigens PRAME zu finden ist, es sich also um ein PRAME-spezifisches Peptid handelt. Es wurden zudem keine Peptide mit nur einer ausgetauschten Aminosäure gefunden. Jedoch wurden 3 Peptide mit zwei ausgetauschten, und 208 Peptide mit 3 ausgetauschten Aminosäuren identifiziert. Es wurden die 3 Peptide mit den 2 ausgetauschten Aminosäuren, und ein in vielen Geweben stark überexprimiertes Peptid mit 3 ausgetauschten Aminosäuren für eine Testung des TCR-3825 ausgewählt (siehe Tabelle III-10, die ausgetauschten Aminosäuren sind rot markiert).

Tabelle III-10: Peptidsequenzen dem SLL-Epitop ähnlicher Peptide

Peptidsequenz	Protein	
SLLQH ^L IGL	PRAME	
S ^F L ^V H ^L IGL	HTR2C	2 Aminosäuren ausgetauscht
P ^L LLQ ^S LIGL	CSE1L	
SLLQ ^G LIG ^A	TMEM82	
H ^L LL ^M H ^L LIG ^S	MT-ATP6	3 Aminosäuren ausgetauscht

Zur Testung einer möglichen Kreuzreaktivität durch TCR-3825 wurden T2 Zellen mit diesen vier Peptiden beladen und mit TCR-3825-transfizierten bzw. H₂O-transfizierten PBMC kokultiviert. Zur Negativkontrolle wurden unbeladene (T2φ) und mit einem irrelevanten PRAME-Peptid (ALY-Peptid) beladene T2 Zellen eingesetzt. Mit dem SLL-Peptid beladene APC dienten als Positivkontrolle. Die nach der Kokultur in den Überständen mittels IFN-γ-ELISA ermittelten Zytokinkonzentrationen sind in Abbildung III-19 dargestellt.

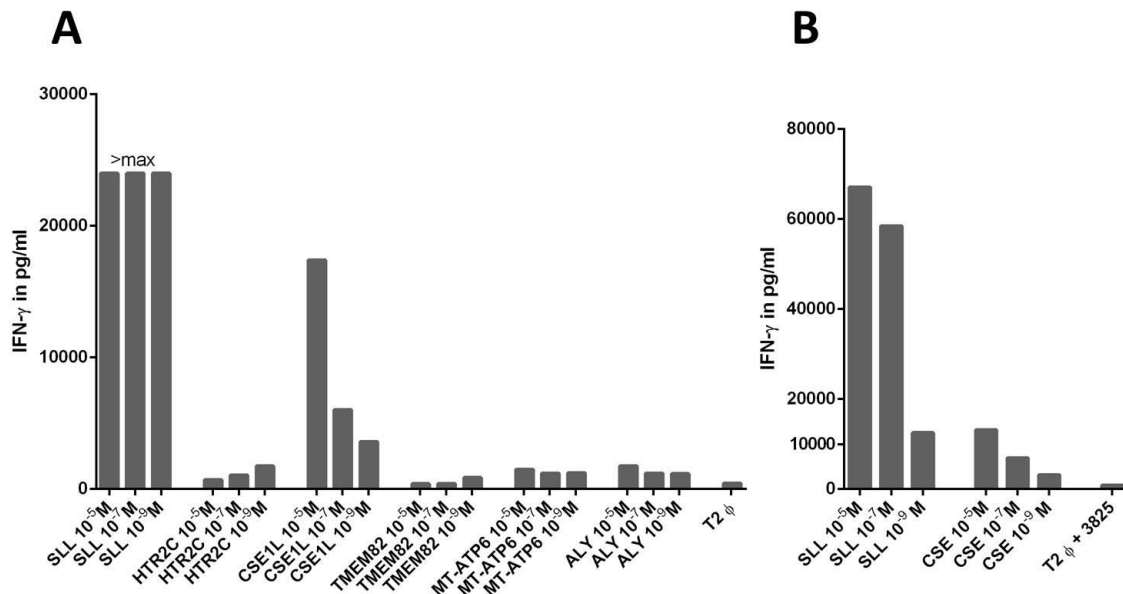


Abbildung III-19: Testung des TCR-3825 auf Kreuzreaktivität mit Peptiden, welche dem Ziel-Epitop von TCR-3825 ähnlich sind

Gezeigt sind die nach Kokultivierung mittels IFN- γ -ELISA in den Überständen gemessenen Zytokinkonzentrationen. Als Zielzellen wurden unbeladene (T2 ϕ) oder mit verschiedenen Peptid-Konzentrationen (10^{-5} M; 10^{-7} M; 10^{-9} M,) beladene T2 Zellen eingesetzt. Als Positivkontrolle wurden mit dem SLL-Peptid beladene, als Negativkontrollen wurden unbeladene und mit dem ALY-Peptid (irrelevantes PRAME-Peptid) beladene T2 Zellen eingesetzt. Als Effektorzellen wurden PBMC entweder mit TCR-3825 oder mit H₂O elektroporiert (Daten nicht gezeigt). Zur Durchführung des IFN- γ -ELISA wurden die frischen Überstände 1:3 verdünnt (A). Um die von der eingesetzten Peptidkonzentration abhängige Titration der Zytokinkonzentration zu zeigen, wurden die Überstände 1:10 verdünnt nochmals gemessen, hier wurden zuvor bei -20°C weggefrorene Überstände verwendet (B).

Dabei hat sich gezeigt, dass TCR-3825 nicht nur sein Epitop (SLLQHLIGL), sondern auch das von Protein CSE1L stammende Peptid PLLQSLIGL erkennt. Trotz zweier unterschiedlicher Aminosäuren in Position 1 und 5 der Peptidsequenz, führt die Erkennung dieses Peptides zu einer deutlichen Stimulation und somit IFN- γ -Freisetzung durch die TCR-3825-exprimierenden T-Zellen. Eine von der Peptidkonzentration abhängige Titration der Zytokinkonzentration ist zu beobachten. Obwohl die durch das CSE1L-Peptid induzierte IFN- γ -Freisetzung im Vergleich zur Positivkontrolle deutlich geringer ausfällt, werden selbst Zielzellen, welche lediglich mit einer Peptidkonzentration von 10^{-9} M beladen wurden, noch erkannt.

Der hier durchgeführte Versuch hat also gezeigt, dass TCR-3825 nicht nur sein spezifisches Epitop erkennt, sondern mit einem Peptid des CSE1L-Proteins

kreuzreagiert. Zu untersuchen bleibt, ob dieses Peptid auch tatsächlich natürlich prozessiert und humanen T-Zellen präsentiert wird. Da es sich bei dem CSE1L-Protein (CAS) jedoch um ein im menschlichen Körper ubiquitär verbreitetes Protein handelt, müssen eingehende Untersuchungen bezüglich dessen Gewebeexpression und Prozessierung durchgeführt werden, um eine mögliche „Off-Target“-Toxizität des TCR-3825 zu evaluieren. Sollten diese Studien allerdings eine „Off-Target-Toxizität“ belegen, so wäre dies ein klares Ausschlusskriterium für TCR-3825 als Kandidat für den adoptiven T-Zell-Transfer.

2.5.8 Retrovirale Transduktion von T-Zellen und PBMC mit TCR-3825

Der T-Zell-Rezeptor 3825 muss in weiterführenden Studien nicht nur dahingehend untersucht werden, ob er als möglicher Kandidat für den adoptiven Transfer von TCR-exprimierender T-Zellen in Betracht kommt, er soll auch als Testsystem für eine aktive DC-Vakzine eingesetzt werden, welche PRAME-spezifische T-Zellen im Patienten induzieren soll.

Für beide Anwendungen ist es von Vorteil, den TCR nicht nur transient (mittels *ivt*-RNA), sondern auch dauerhaft in Effektorzellen einzubringen, um eine stabile TCR-Expression über längere Zeit zu erzielen. Zu diesem Zweck wurden die bisher nur in pGEM-Vektor vorliegenden, für TCR-3825 kodierenden TCR-Sequenzen in retrovirale MP71-Vektoren kloniert. Es wurde die gesamte TCR-3825-Kassette mit Hilfe von Restriktionsenzymen (*AgeI* und *EcoRI*) aus dem pGEM-Vektor ausgeschnitten (siehe Kapitel II Abschnitt 2.8.1) und in den MP71-Vektor ligiert. Die Selektion korrekt ligierter Vektoren und Sequenzanalyse der Vektorkonstrukte erfolgte in gleicher Weise, wie bereits in Kapitel III Abschnitt 2.5.1 beschrieben.

Mit dieser Methode konnte der TCR-3825 nun retroviral, stabil in Effektorzellen transduziert werden. Als Effektoren wurden zum einen T-Zellen definierter Spezifität, zum anderen PBMC transduziert (siehe Kapitel II, Abschnitt 2.1.11-12). Als T-Zell-Klon wurde der MART-1-spezifische T-Zell-Klon SW-M1 67 (bereitgestellt von Susanne Wilde; erkennt das ELA-Peptid ELAGIGILTV)

transduziert. Durch Antikörperfärbung der in TCR-3825 enthaltenen murinisierten C-Region, konnte der Anteil erfolgreich transduzierter T-Zellen mittels FACS-Analysen ermittelt werden. Eine erste Analyse der transduzierten T-Zellen zeigte, dass zunächst nur 1% der T-Zellen den transduzierten TCR-3825 trugen (Abbildung III-20 A). Nach gezielter Restimulation des T-Zell-Klones mit SLL-Peptid-beladenen T2 Zellen, konnte eine 10-fache Anreicherung der TCR-3825-transduzierten, SLL-spezifischen T-Zellen erzielt werden (Abbildung III-20 B).

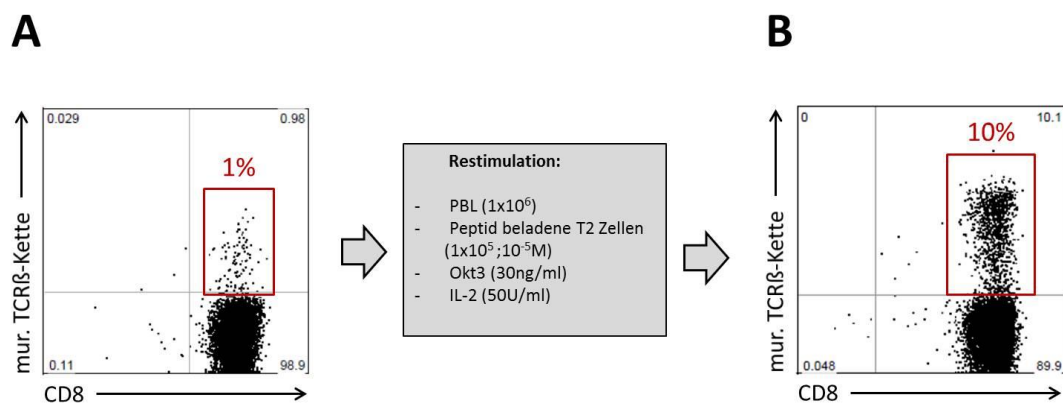


Abbildung III-20: Transduktionseffizienz des mit TCR-3825 transduzierten T-Zell-Klones SW-M1 67

Gezeigt sind die nach Antikörperfärbung (spezifisch für CD8 und die C-Region der murinen TCRβ-Kette des TCR-3825) durchgeführten FACS-Analysen.

A: FACS-Analyse 4 Tage nach der 2. Transduktion

B: FACS-Analyse 14 Tage nach der 2. Transduktion und 10 Tage nach spezifischer Restimulation (grauer Kasten) der TCR-3825 transduzierten T-Zellen. Rot markiert sind jeweils die TCR-3825-positiven T-Zellen, angegeben ist dabei der Prozentsatz TCR-3825-transduzierter T-Zellen, anteilig an der Gesamtpopulation.

Zur Funktions-Analyse der transduzierten SW-M1 67 T-Zellen (Abbildung III-21 A), wurden Peptid-beladene T2 Zellen sowohl mit den nicht-transduzierten (hellgraue Balken), als auch mit den TCR-3825-transduzierten T-Zellen (dunkle Balken) kokultiviert. Durch Messung der Zytokinkonzentrationen in den Überständen mittels IFN-γ-ELISA wurde überprüft, ob neben der endogenen Spezifität des T-Zell-Klones (erkennt das ELA-Peptid), durch die Transduktion von TCR-3825 auch eine spezifische Erkennung des SLL-Peptides nachgewiesen werden konnte.

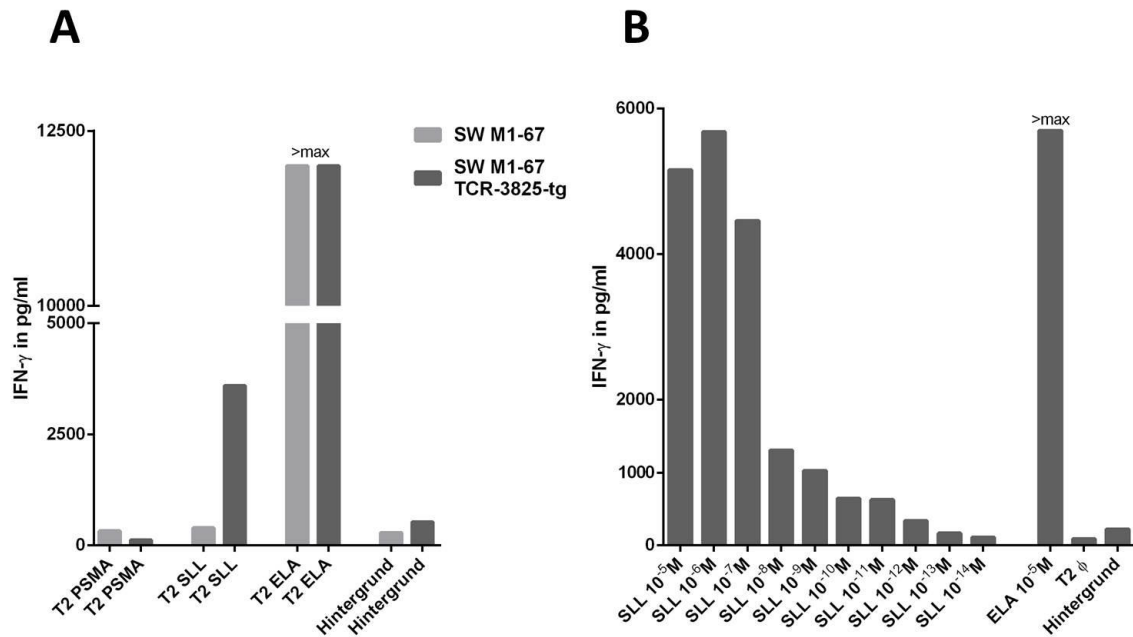


Abbildung III-21: Funktionsanalysen des mit TCR-3825 transduzierten T-Zell-Klones SW-M1 67

Dargestellt sind die nach Kokultur in den Überständen mittels IFN- γ -ELISA gemessenen Zytokinkonzentrationen (pg/ml). Als Effektorzellen wurden nicht-transduzierte (hellgraue Balken, Daten in B nicht gezeigt) und mit TCR-3825 transduzierte SW-M1 67 T-Zellen eingesetzt.

A: Als Zielzellen wurden T2 Zellen mit einem irrelevanten PSMA-Peptid (ALFDIESKV; Negativkontrolle), mit dem SLL-Peptid oder dem ELA-Peptid beladen).

B: Als Zielzellen wurden T2 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des SLL-Peptids (10^{-5} M bis 10^{-14} M) beladen. Mit dem ELA-Peptid beladene T2 Zellen dienten als Positivkontrolle, unbeladene T2 Zellen als Negativkontrolle.

Dabei hat sich gezeigt, dass die TCR-3825-transduzierten T-Zellen neben dem ELA-Peptid (für welches der T-Zell-Klon spezifisch ist) auch SLL-Peptid-präsentierende T2 Zellen erkennen (Abbildung III-21 A). Zusätzlich zu dem endogenen TCR, trägt der T-Zell-Klon also auch den transduzierten TCR-3825, welcher die SLL-Spezifität vermittelt. Auch konnte die erwartete, von der Peptidkonzentration abhängige Titration des sezernierten IFN- γ beobachtet werden (Abbildung III-21 B). Dabei ist auch zu sehen, dass selbst T2 Zellen, welche mit nur 10^{-11} M des SLL-Peptides beladen wurden, von den transduzierten T-Zellen noch deutlich erkannt werden (628pg/ml IFN- γ).

Nachdem also die Transduktion eines T-Zell-Klones mit TCR-3825 erfolgreich durchgeführt werden konnte, sollte nun außerdem gezeigt werden, dass auch

PBMC mit dem für TCR-3825 kodierenden Vektorkonstrukt retroviral transduziert werden können. Abbildung III-22 A zeigt die zur Ermittlung der Transduktionseffizienz durchgeführte FACS-Analyse. Für eine Funktionsanalyse wurden sowohl TCR-3825-transduzierte PBMC, als auch parallel eGFP-transduzierte PBMC (als Negativkontrolle) mit verschiedenen Zielzellen kokultiviert. Als Zielzellen wurden entweder unbeladene oder mit dem ELA-Peptid beladene (als Negativkontrollen) oder mit dem SLL-Peptid beladene T2 Zellen eingesetzt. Die in den Überständen der Kokulturen gemessenen IFN- γ -Konzentrationen sind in Abbildung III-22 B dargestellt.

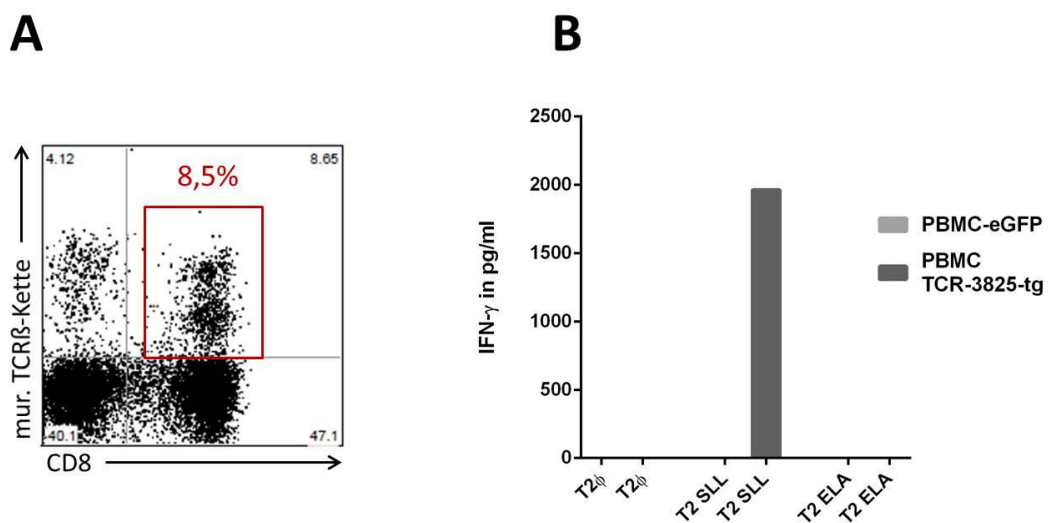


Abbildung III-22: Transduktionseffizienz und Funktionsanalyse der mit TCR-3825 transduzierten PBMC

A: Gezeigt ist die nach Antikörperfärbung (spezifisch für CD8 und die C-Region der murinen TCR β -Kette des TCR-3825) durchgeführte FACS-Analyse. Rot markiert sind die TCR-3825-positiven, CD8-positiven T-Zellen, angegeben ist dabei der prozentuale Anteil doppelt-positiver Zellen an der PBMC-Gesamtpopulation.

B: Gezeigt sind die nach Kokultur in den Überständen mittels IFN- γ -ELISA gemessenen Zytokinkonzentrationen. Als Effektorzellen wurden entweder TCR-3825-transduzierte, oder eGFP-transduzierte PBMC (Negativkontrolle) eingesetzt. Diese wurden entweder mit unbeladenen (Negativkontrolle), mit dem SLL-Peptid oder mit dem ELA-Peptid (Negativkontrolle) beladenen T2 Zellen kokultiviert.

Bei diesem Funktionstest hat sich gezeigt, dass nur die mit TCR-3825 transduzierten PBMC die mit dem SLL-Peptid beladenen T2 Zellen erkennen. Die als Negativkontrolle verwendeten Zielzellen konnten bei den transduzierten

Zellen keine Zytokinsekretion induzieren. Somit konnte auch eine erfolgreiche Transduktion von PBMC mit den für TCR-3825 kodierenden, retroviralen Vektorkonstrukten nachgewiesen werden.

2.6 Erste Funktionsanalyse des PSMA-spezifischen TCR-3822

Wie in Abbildung III-11 gezeigt, konnte auch bei den aus der PSMA-immunisierten Maus 3822 isolierten TCR-Sequenzen nur jeweils eine dominante TCR α - und eine dominante TCR β -Kette identifiziert werden. Daher sollten nun auch diese TCR-Sequenzen dahingehend getestet werden, ob sie tatsächlich zu einem funktionellen T-Zell-Rezeptor (von nun an TCR-3822) paaren.

Wie in Kapitel III Abschnitt 2.5.1 bereits für den TCR-3825 beschrieben, wurden auch die für TCR-3822 kodierenden TCR-Sequenzen in pGEM-Vektoren ligiert. Nach Überprüfung der in den Vektorkonstrukten enthaltenen TCR-Sequenzen, wurden diese zur Herstellung TCR-3822-kodierender *ivt*-RNA verwendet. Durch die Transfektion von Effektorzellen mit der für die TCR-3822- α/β -Ketten kodierenden *ivt*-RNA konnte dieser TCR nun transient re-exprimiert werden.

Für eine erste Funktionsanalyse wurden als Effektorzellen PBMC entweder mit TCR-3822 oder mit H₂O (Negativkontrolle) transfiziert. Die Effektorzellen wurden mit verschiedenen Zielzellen kokultiviert und mittels IFN- γ -ELISA wurden die Zytokinkonzentrationen in den Überständen bestimmt (siehe Abbildung III-23). Als Negativkontrollen wurden entweder unbeladene oder mit dem irrelevanten SLL-Peptid beladene T2 Zellen eingesetzt. Zudem wurden T2 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des PSMA-Peptides (ALFDIESKV; 10-5M; 10-7M; 10-9M; 10-11M) beladen, welches für die Immunisierung der Maus verwendet wurde.

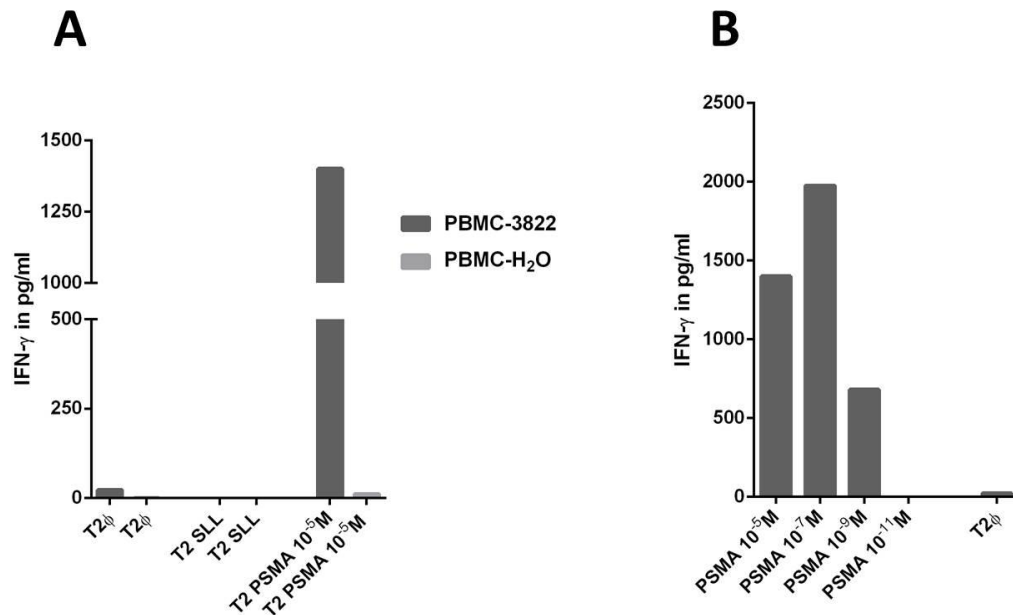


Abbildung III-23: Funktionsanalyse der mit TCR-3822 transduzierten PBMC

Gezeigt sind die nach Kokultur in den Überständen mittels IFN- γ -ELISA gemessenen Zytokinkonzentrationen. Als Effektoren wurden entweder TCR-3822 transfizierte PBMC (dunkle Balken) oder mit H₂O elektroporierte PBMC (in B nicht gezeigt) eingesetzt.

A: Als Zielzellen wurden T2 Zellen verwendet, welche entweder unbeladen oder mit dem irrelevanten SLL-Peptid beladen als Negativkontrolle dienen. Zusätzlich wurden mit dem PSMA-Peptid (ALFDIESKV) beladene T2 Zellen eingesetzt.

B: Die Beladung der T2 Zellen erfolgte mit verschiedenen Konzentrationen des PSMA-Peptids (10⁻⁵ M; 10⁻⁷ M; 10⁻⁹ M; 10⁻¹¹ M). Unbeladene T2 Zellen wurden als Negativkontrolle eingesetzt.

Bei diesem ersten Funktionstest hat sich gezeigt, dass nur mit dem PSMA-Peptid beladene APC von TCR-3822 transfizierten PBMC erkannt werden und zu einer Stimulation und IFN- γ -Freisetzung der T-Zellen führen. Auch konnte gezeigt werden, dass selbst eine Peptidkonzentration von 10⁻⁹ M durch TCR-3822 noch erkannt wird.

Somit scheinen die aus der PSMA-immunisierten Maus 3822 isolierten und als dominant identifizierten TCR α/β -Ketten zu einem T-Zell-Rezeptor zu paaren, welcher eine Peptid-spezifische Erkennung vermittelt. Eine genauere Charakterisierung dieses T-Zell-Rezeptors steht noch aus.

IV DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war die Induktion Antigen-spezifischer T-Zellen in TCR-humanisierten Mäusen. Es sollten T-Zellen induziert werden, welche für verschiedene Prostatakrebs-assoziierte Antigene (CaP-Antigene) spezifisch sind. Die anschließend isolierten T-Zell-Rezeptoren sollten sequenziert und mittels Re-Expressions-Analysen funktionell genauer charakterisiert werden. Dabei sollte primär untersucht werden, ob sich die isolierten TCR möglicherweise als TCR-Kandidaten für den adoptiven T-Zell-Transfer eignen. Des Weiteren sollten die isolierten TCR dahingehend untersucht werden, ob sie sich als Testsystem für eine DC-Vakzine eignen, welche eine CaP-spezifische T-Zell-Antwort in Prostatakrebs-Patienten induzieren soll.

Hoch affine humane TCR zu induzieren, welche für humane Selbstpeptide spezifisch sind, ist aufgrund der negativen Selektion insbesondere von hoch affinen T-Zell-Rezeptoren im Thymus schwierig (Morris und Allen, 2012). Aus Patienten isolierte, Selbstpeptid-spezifische TCR sind daher lediglich niedrig bis intermediär affin für ihr jeweiliges Antigen (Starr et al., 2003; Aleksic et al., 2012). Für diese Arbeit sollten hoch affine TCR nicht, wie es bisher meistens üblich ist, durch *in-vitro*-Primings generiert (Sadovnikova et al., 1998; Savage et al., 2004; Wilde et al., 2012), oder aus immunisierten, HLA-A*02:01-transgenen Mäusen isoliert werden (Parkhurst et al., 2011; Morgan et al., 2013), sondern in TCR-humanisierten ABabDII-Mäusen induziert werden.

Im folgenden Abschnitt sollen nun die Ergebnisse dieser Arbeit diskutiert werden, und zwar besonders im Hinblick auf das verwendete Mausmodell. Die Vergleichbarkeit des ABabDII-Mausmodells zum humanen System, auch bezüglich der isolierten TCR-Sequenzen und der identifizierten T-Zell-Rezeptoren wird diskutiert. Sowohl der in der vorliegenden Arbeit genau charakterisierte, PRAME-spezifische TCR-3825, als auch die zukünftig noch ausstehenden Untersuchungen sollen kritisch betrachtet, und jeweils im Hinblick auf aktuelle Forschungsergebnisse genauer ausgeführt werden.

1.1 Induktion Antigen-spezifischer T-Zellen im ABabDII-Maumodell

Bei ABabDII-Mäusen handelt es sich um ein Mausmodell, welches für den kompletten TCR α/β -Genlocus und humanes HLA-A*02:01 transgen ist. Gleichzeitig sind die Tiere für die entsprechenden murinen TCR α/β -Genloci und murines H2-D defizient (Li et al., 2010 und Li et al., 2013). Humane Selbstpeptide werden von der Maus als „fremd“ erkannt, deshalb unterliegen murine T-Zellen mit hoch affinen TCR für humane Selbstpeptide keiner negativen Selektion und können durch Immunisierung der Tiere mit geeigneten Peptiden spezifisch induziert werden. Die Generierung dieses Mausmodells durch die Arbeitsgruppe von Prof. Blankenstein (Institut für Molekulare Medizin, MDC Berlin) hat über 7 Jahre in Anspruch genommen und stellt ein äußerst potentes Hilfsmittel zur Generierung hoch affiner humaner TCR dar.

In dieser Arbeit wurden die Prostatakrebs-assoziierten Antigene PRAME (ein CTA), PSMA, PSA, PSCA, PCTA und STEAP (überexprimierte Antigene) ausgewählt, um mit Hilfe der ABabDII-Mäuse hoch affine TCR gegen diese Antigene zu generieren. Obwohl ein Antigen für sehr viele potentiell immunogene Epitope kodieren kann, sind nur sehr wenige dieser Epitope tatsächlich in der Lage, eine T-Zell-Antwort zu induzieren (Sercarz et al., 1993; Yewdell und Del Val, 2004; Chen und McCluskey, 2006; Lo et al., 2014). Daher wurde die Wahl geeigneter Antigen-Peptide zur Immunisierung der Mäuse zum einen aufgrund klinischer Daten von Brill et al. (2007 und 2009) getroffen, welche in ihren Studien immundominate Peptide verschiedener CaP-Antigene identifizieren konnten. Zum anderen wurden Peptide ausgewählt, welche aufgrund ihrer Peptidsequenz von den Mäusen als „fremd“ erkannt wurden und zudem eine starke Affinität zum in den ABabDII-Mäusen exprimierten humanen MHC-Klasse-I-Molekül (HLA-A*02:01) aufwiesen. Dadurch sollte die negative Selektion hoch affiner TCR verhindert und eine adäquate Peptid-MHC-Bindung sichergestellt werden, welche für eine erfolgreiche T-Zell-Induktion laut Engels et al. essentiell ist (Engels et al., 2013; Kammertoens et al., 2013).

Die Immunisierung der ABabDII- Mäuse hat gezeigt, dass gegen vier der sechs verwendeten Peptide (PRAME, PSMA, PSCA, STEAP) spezifische T-Zellen generiert werden konnten. Gegen das PSA-Peptid und das PCTA-Peptid konnten auch nach wiederholten Immunisierungen keine spezifischen T-Zellen induziert werden. Das PCTA-Peptid besitzt im Vergleich zu den anderen 5 Peptiden eine relativ geringe Affinität für das MHC-Klasse-1-Molekül HLA-A*02:01. Aufgrund einer unzureichenden Bindung ans MHC-Molekül fand möglicherweise keine ausreichende Präsentation dieses Peptides durch Antigen-präsentierende Zellen statt, was die ausbleibende T-Zell-Antwort erklären könnte. Im Falle des PSA-Antigens, wurde für die Immunisierung der Tiere ein längeres Peptid verwendet (FLTPKKLQCVDLHVISNDVCAQV), gegen welches Brill et al. spezifische T-Zellen aus Prostatakrebs-Patienten isolieren konnten. Die Länge dieses PSA-Peptids setzt jedoch voraus, dass es für eine Präsentation an T-Zellen vorher noch verkürzt/prozessiert werden muss, da CD8-T-Zell Epitope üblicherweise nur 8-11 Aminosäuren lang sind. Das zur Immunisierung verwendete 23-mer enthält zwei kürzere Peptide mit hoher Peptid-MHC-Affinität (FLTPKKLQCV und KLQCVDLHVI), welche also mögliche T-Zell-Epitope darstellen. Der Nachweis Peptid-spezifischer T-Zellen aus Patienten, die jedoch ausbleibende Induktion in AbabDII-Mäusen legt den Schluss nahe, dass das Peptid von den murinen Zellen womöglich anders als im humanen System prozessiert wird und somit keine geeigneten, immundominanten Peptide präsentiert werden. Für zukünftige Versuche sollte die Immunisierung der Tiere mit den kürzeren Peptiden wiederholt werden, welche aufgrund ihrer Größe nicht mehr prozessiert sondern direkt präsentiert werden können.

Gegen die PRAME-, PSMA-, PSCA- und STEAP-Peptide konnten nach Immunisierung spezifische T-Zellen in den Mäusen nachgewiesen werden. Je nachdem, in welchem Ausmaß (Anzahl Tiere und Frequenz Peptid-spezifischer T-Zellen) eine T-Zell-Antwort induziert werden konnte, wurden die Tiere unterschiedlich oft geboostet (3-5x). Dabei war auffällig, dass es große Unterschiede bezüglich der induzierten Frequenzen Peptid-spezifischer T-Zellen gab, sowohl innerhalb der Gruppen, als auch in Abhängigkeit vom für die Immunisierung verwendeten Antigen-Peptid. So wurden durch die Immunisierung mit dem PRAME- und dem PSMA-Peptid deutlich höhere Frequenzen Peptid-spezifischer T-Zellen induziert (bei einzelnen Tieren bis zu 10-18%), als mit dem

STEAP- und PSCA-Peptid (max 5%). Dies könnte möglicherweise an bereits vorhandenen, PRAME-spezifischen Vorläufer-T-Zellen liegen (Rezvani et al., 2009), wie es bereits für verschiedene Leukämie-assoziierte Antigene zumindest beim Menschen beschrieben wurde (Rezvani et al., 2003; Rezvani et al. 2005). Auch PSMA-spezifische Vorläufer T-Zellen wurden bereits beschrieben (Schroers et al., 2003). Des Weiteren wurden auch bei den mit dem gleichen Peptid immunisierten Mäusen große Unterschiede bezüglich der Frequenz Peptid-spezifischer T-Zellen festgestellt. So wurden z.B. in der PRAME-Gruppe bei den Mäusen 3815, 3823 und 3833 jeweils nur etwa 1-2,5% Peptid-spezifische CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen, wohingegen es bei den Mäusen 3825, 3969 und 3973 10 bis 18% Peptid-spezifische CD8⁺ T-Zellen waren. Dabei muss man bedenken, dass auch bei Tieren mit dem gleichen genetischen Hintergrund die Immunkompetenz nicht bei allen Tieren gleich ist und jedes Individuum auf eine Immunisierung anders reagieren kann.

1.2 Isolierung Antigen-spezifischer T-Zellen

Um sicherzustellen, dass spezifische T-Zellen nicht nur induziert, sondern anschließend auch erfolgreich isoliert werden können, wurden in einem Vorversuch zunächst drei verschiedene Methoden zur Isolierung Peptid-spezifischer T-Zellen aus den ABAbDII-Mäusen miteinander verglichen. Da es durch Li et al. (2010) bereits Erfahrungswerte zur erfolgreichen Isolierung MART-1-spezifischer T-Zellen mit Hilfe eines MART-1-Tetrameres gab, wurden MART-1-immunisierte ABAbDII-Mäuse als Modellsystem verwendet. Dabei hat sich gezeigt, dass sowohl mittels Tetrameren, als auch durch einen IFN- γ -Capture Assay und die Antikörperfärbung des T-Zell-Aktivierungsmarkers CD137 und anschließender Sortierung der entweder Tetramer-positiven, IFN- γ -positiven oder CD-137-positiven T-Zellen, Peptid-spezifische T-Zellen isoliert werden konnten. Dabei konnten nicht nur mit allen drei Methoden MART-1-spezifische T-Zellen isoliert werden, es konnten teilweise sogar die exakt gleichen T-Zellen (mit identischen TCR-Sequenzen) isoliert werden, was die Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Methoden belegte. Allerdings sind Tetramere sehr teuer und aufgrund der fehlenden Expression von humanem CD8 auf den murinen T-Zellen,

welches für die Bindung der Tetramere eine Rolle spielt, bezüglich ihrer Funktion ungewiss. Deshalb wurde aufgrund der in diesem Vorversuch gemachten Beobachtungen die Entscheidung getroffen, die gegen die CaP-Peptide induzierten T-Zellen mit Hilfe des IFN- γ -Capture-Assays und der CD 137-Antikörper-Färbung zu isolieren. Diese beiden Methoden haben zusätzlich den Vorteil, dass die entweder IFN- γ -positiven oder CD 137-positiven T-Zellen nicht nur eine spezifische Erkennung ihres Peptides zeigen (wie auch durch die Bindung an ein Tetramer). Die initiierte Expression des Aktivierungsmarkers (Alderson et al., 1994) bzw. die Sekretion des Zytokins (Becker et al. 2001) zeigt, dass es sich nicht nur um spezifische, sondern auch funktionelle T-Zellen handelt. Die Isolierung zwar spezifischer, möglicherweise jedoch aneurer T-Zellen sollte damit verhindert werden. Für diese Arbeit wurden die Tiere mit kurzen Peptiden (9-meren) immunisiert, womit die Spezifität der induzierten T-Zellen bereits vorgegeben war. Sollten in zukünftigen Versuchen jedoch längere Peptide oder Antigen-DNA zur Immunisierung der Tiere verwendet werden, um T-Zellen gegen noch unbekannte Antigen-Epitope zu induzieren, so wäre auch in diesem Fall die Isolierung Antigen-spezifischer T-Zellen nur mittels IFN- γ -Capture-Assay oder CD-137-Färbung sinnvoll, da mittels Tetrameren nur T-Zellen einer einzigen Spezifität isoliert werden können.

1.3 Identifizierung der T-Zell-Rezeptor-Sequenzen

Durch die Sortierung der entweder mit IFN- γ -Capture-Reagenzien oder mit dem CD 137-Antikörper gefärbten Milzzellen konnten die Peptid-spezifischen, CD8⁺ T-Zellen angereichert werden. Es konnten jeweils mindestens 2×10^3 (maximal $1,5 \times 10^4$) Zellen isoliert werden. Trotz dieser geringen Zellzahlen konnte die zelluläre Gesamt-RNA isoliert und mittels RACE-PCR mit genspezifischen Primern die TCR α/β -DNA-Sequenzen amplifiziert werden. Dabei konnte aus den Proben aller Tiere TCR α -kodierende cDNA amplifiziert werden, wohingegen dies für die TCR β -Kette nicht bei allen Proben möglich war, was möglicherweise in einer verminderten Bindung des TRBC-Primers bzw. des nested-TRBC-Primers (genspezifische Primer, welche sich an die konstante Region der TCR β -Kette anlagern) begründet ist. Um die aus einer Maus amplifizierten TCR-Sequenzen zu

identifizieren, wurden die Sequenzen durch „blunt-end“-Ligierung in entsprechende Vektoren vereinzelt, woraufhin die TCR-Sequenzen mittels Sequenzierung bestimmt werden konnten.

Die dabei identifizierten TCR-Sequenzen zeigen eine breite Verteilung über das ganze TCR α - und TCR β -Repertoire (Abb. IV-1), was darauf hindeutet, dass kein präferentielles, durch das Mausmodell bedingtes, Rearrangement bestimmter TCR-Gensegmente stattfindet. Was jedoch auffällt, ist eine möglicherweise bevorzugte Verwendung ganz bestimmter TCR α - und TCR β -Gensegmente, welche bei den mit dem PRAME-Peptid immunisierten Tieren vom Antigen abhängig zu sein scheint. Ähnliches wurde bereits für das MART-1-Antigen beschrieben, sowohl im humanen System (Trautmann et al., 2002; Cole et al., 2009; Pinto et al., 2014) als auch bei ABAbDII-Mäusen (Li et al., 2010). Auch wenn die bei MART-1-spezifischen T-Zellen präferenzielle Verwendung der TCR-V α -Kette (TRAV12-2) im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte, so gibt der Nachweis identischer TCR α -Ketten (inkl. identischer CDR3-Regionen) in zwei verschiedenen Tieren durchaus einen Hinweis auf eine dominante bzw. bevorzugte TCR-Entwicklung bezüglich des MART-1-Antigens. Im Fall der PRAME-spezifischen TCR scheinen die TRAV12-3 bei der TCR α -Kette, und die TRBV3-1 und TRBV27-1 bei der TCR β -Kette am häufigsten rearrangiert zu werden.

Für die STEAP-, PSCA- und PSMA-spezifischen TCR scheint es keine präferentiell rearrangierten TCR-V-Regionen zu geben.

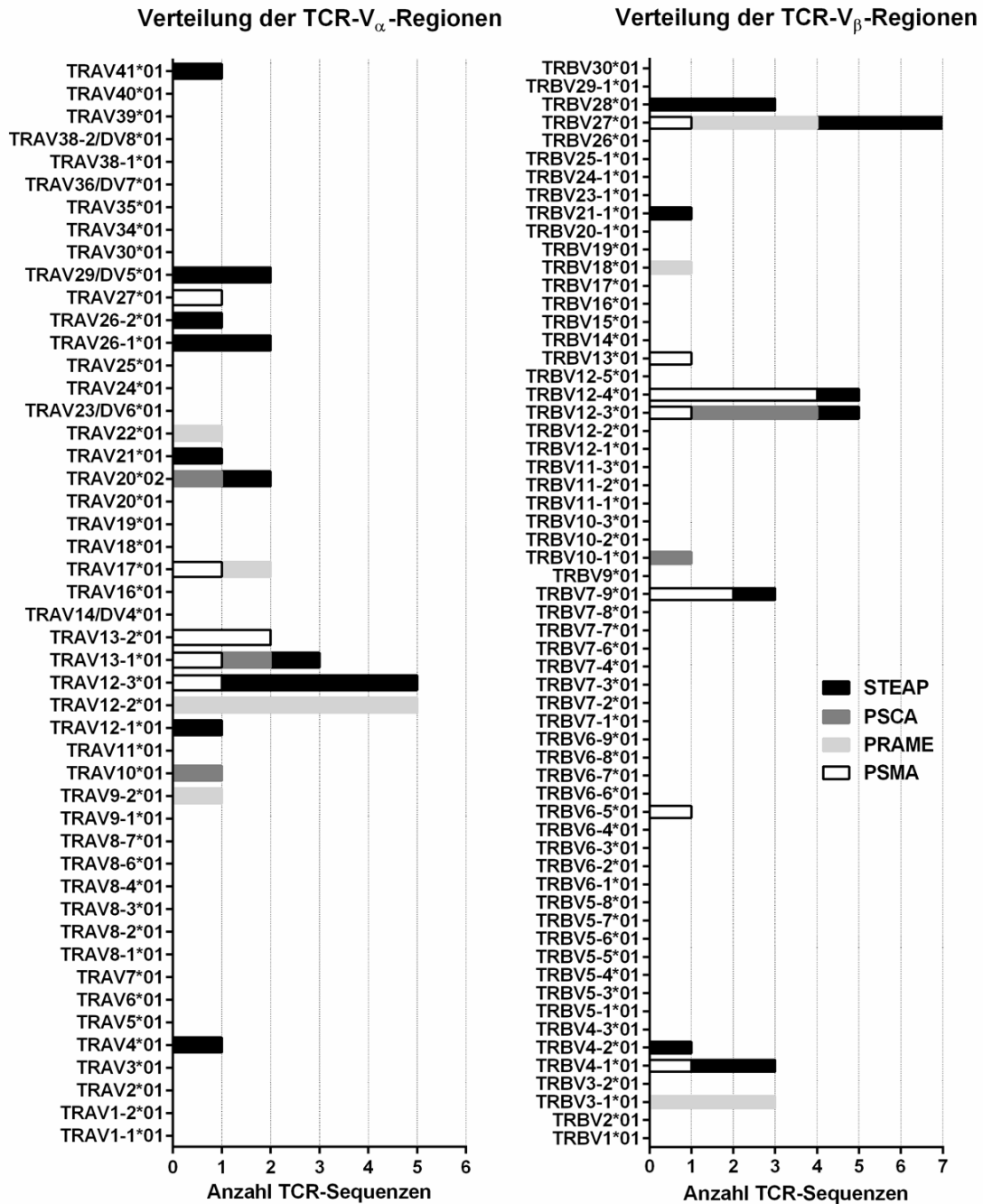


Abbildung IV-1: Häufigkeiten der aus den ABabDII-Mäusen isolierten TCR-V_α- und TCR-V_β-Regionen

Angegeben sind die Häufigkeiten der TCR-V_α- (rechts) und -V_β-Regionen (links), welche aus den mit dem PSCA- (schwarz), STEAP- (dunkelgrau), PRAME- (hellgrau) oder PSMA-Peptid (weiß) immunisierten ABabDII-Mäusen isoliert wurden. So wurde beispielsweise insgesamt 7x die TRBV12-4*01 isoliert, 4x aus PSMA-immunisierten ABabDII-Mäusen und 3x aus PSCA immunisierten Mäusen.

Aus drei Tieren, zwei PRAME-immunisierten Mäusen (ID:3825 und 3833) und einer PSMA-immunisierten Maus (ID: 3822) wurden nur je eine dominante TCR α -Kette und eine dominante TCR β -Kette isoliert. Dies ließ auf eine quasi monoklonale T-Zell-Antwort der ABabDII-Mäuse nach Immunisierung mit den entsprechenden Peptiden schließen. Die Zusammengehörigkeit dieser isolierten TCR $\alpha\beta$ -Ketten und deren Rekombination zu einem funktionellen TCR war somit sehr wahrscheinlich, was mittels Re-Expressionsanalysen untersucht werden sollte und anschließend diskutiert wird.

Bei vielen Tieren wurden aus der angereicherten, Peptid-spezifischen T-Zell-Population mehrere TCR α - und TCR β -Sequenzen isoliert, so dass deren Zusammengehörigkeit nicht eindeutig war. Um aus diesen Proben die zusammengehörigen TCR-Sequenzen identifizieren zu können, müssten alle aus einer Probe isolierten TCR α -Sequenzen in Kombination mit allen TCR β -Sequenzen re-exprimiert werden. Dies setzt natürlich die Klonierung aller isolierten TCR-Sequenzen voraus. Im Fall einer korrekten Re-Expression zusammengehöriger Ketten sollte dann eine spezifische Erkennung des für die Immunisierung verwendeten Antigens nachweisbar sein. Diese kombinatorische Re-Expression zur Identifizierung weiterer TCR steht noch aus.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die Isolierung und Identifizierung der TCR-Sequenzen aus den isolierten T-Zellen der ABabDII-Mäuse erfolgreich durchgeführt werden konnte. Jedoch ist das hier beschriebene Verfahren sowohl sehr zeitaufwändig als auch Kosten-intensiv. Auch gilt zu bedenken, dass die Isolierung der TCR-Sequenzen aus der gesamten Peptid-spezifischen T-Zell-Population einer Maus nur im Falle einer monoklonalen oder zumindest sehr dominanten Antigen-spezifischen T-Zell-Antwort die direkte Identifizierung eindeutig zusammengehöriger TCR-Sequenzen ermöglicht. Daher sollte für zukünftige Versuche die Durchführung von Einzel-Zell-Sortierungen und anschließende „Single-Cell-PCR“ (Dash et al., 2011; Kim et al., 2012; Dössinger et al., 2013) in Betracht gezogen werden. Durch Amplifikation der TCR $\alpha\beta$ -Sequenzen aus einer einzelnen T-Zelle, würde die Isolierung mehrerer TCR $\alpha\beta$ -Sequenzen aus T-Zellen mit zwar gleicher Spezifität, jedoch unterschiedlichen T-Zell-Rezeptoren ausgeschlossen. Eine weitere Möglichkeit wäre die Analyse der gesamten murinen CD8⁺ T-Zell-Population mittels „next-generation“-DNA-Sequenzierung (Holt und Steven, 2008; Robins et al., 2009; Freeman et al., 2009; Bolotin et al., 2012) oder „TCR-Gene-Capture“ (Linnemann et al., 2013). Bei

dieser Methode handelt es sich um ein DNA-basiertes Verfahren, bei dem die für die TCR-V-Regionen kodierenden Gen-Loci spezifisch eingefangen und sequenziert werden. Dabei können die aus einem T-Zell-Pool isolierten TCR α/β -Sequenzen anhand ihrer Frequenz einander zugeordnet werden („frequency-based-matching“). Linnemann et al. konnten mittels Frequenz-basiertem TCR-Gene-Capture bereits erfolgreich Antigen-spezifische (NY-ESO-1-spezifische) TCR aus ABAbDII-Mäusen isolieren. Sowohl mittels Einzel-Zell-PCR als auch mittels Frequenz-basierter DNA-Sequenzierung der dritten Generation sollte sich die Effizienz einer erfolgreichen Isolierung zusammengehöriger TCR-Sequenzen zukünftig deutlich steigern lassen.

1.4 Charakterisierung des PRAME-spezifischen TCR-3825

Der aus einer PRAME-immunisierten Maus isolierte TCR-3825 war der erste T-Zell-Rezeptor, welcher isoliert und somit auch genauer charakterisiert werden konnte. TCR-3825 wurde gegen das PRAME-Peptid SLLQHLIGL induziert, und aufgrund des genetischen Hintergrundes der ABAbDII-Mäuse sollte dieser Rezeptor HLA-A*0201-restringiert sein. Bei den isolierten TCR-Sequenzen handelt es sich um die TRAV22*01 F (CDR3: CAVEPGGSYIPTF) und die TRBV27*01 F (CDR3: CASSPGLSY EQYF). Um Re-Expressionsanalysen mit diesem TCR durchzuführen, wurden die für die CDR3-Regionen der TCR-V α/β -Regionen kodierenden Oligonukleotide in Vektoren einer TCR-Bibliothek kloniert (von Dr. S. Milosevic), welche bereits die entsprechenden V-Regionen enthielten. Bei den verwendeten Vektoren handelte es entweder sich um pGEM-Vektoren mit einem T7-Promotor, welcher das Umschreiben der für die TCR-3825-Sequenzen kodierenden DNA in *ivt*-RNA mittels eines kommerziell erhältlichen Kits ermöglichte. Alle Versuche zur genaueren Charakterisierung des TCR-3825 wurden mit *ivt*-RNA-transfizierten Effektorzellen durchgeführt (transiente TCR-Expression). Alternativ wurden die TCR-Sequenzen später auch in retrovirale MP71-Expressionsvektoren kloniert, womit eine stabile TCR-Expression in Effektor-Zellen erreicht werden sollte.

Zunächst wurden TCR-3825-exprimierende Effektorzellen auf Erkennung von PRAME-exprimierenden, sowohl HLA-A2-positiven (K562-A2) als auch HLA-

A2-negativen (K562) Zielzellen (eigene PCR-Analysen und Ikeda et al., 1997) getestet. Dabei zeigte TCR-3825 eine HLA-A2-abhängige Erkennung der PRAME-exprimierenden Zielzellen. Weder HLA-A2-negative K562-Zellen, noch HLA-A2-positive/PRAME-negative Zielzellen wurden erkannt. Zum einen konnte dadurch erstmals gezeigt werden, dass die isolierten TCR α/β -Ketten zu einem funktionalen TCR paaren, welcher zum anderen eine sowohl Antigen- als auch HLA-A2-abhängige Erkennung vermittelt.

Durch Beladung von T2-Zellen mit dem PRAME-Peptid, gegen welches TCR-3825 generiert wurde, und die dabei beobachtete spezifische Erkennung der mit dem SLL-Peptid beladenen Zielzellen, konnte das Epitop von TCR-3825 bestätigt werden. Durch die Testung des Rezeptors an mit verschiedenen Peptid-Konzentrationen beladenen T2-Zellen konnte außerdem gezeigt werden, dass es sich tatsächlich um einen für sein Epitop hoch affinen TCR handelt; die halbmaximale IFN- γ -Sekretion erfolgte bei einer Peptidkonzentration zwischen 10^{-9} M bis 10^{-10} M. Die Studien von Ikeda et al. (1997), Kessler et al. (2001) und Brill et al. (2007 und 2009), haben bereits gezeigt, dass es sich bei dem SLL-Peptid um ein natürlich prozessiertes und präsentierte Peptid, und somit um ein immundominantes T-Zell-Epitop handelt. Um dies zu bestätigen, wurden PRAME-negative mLCL als Zielzellen mit, für das komplette PRAME-Antigen kodierender, *ivt*-RNA transfiziert. Durch Erkennung der PRAME-transfizierten, nicht jedoch der untransfizierten, Zielzellen durch TCR-3825 wurde die Immundominanz des SLL-Epitops bestätigt. TCR-3825 erkennt also nicht nur Zielzellen, die exogen mit dem Peptid beladen wurden, sondern auch solche, die das natürliche Antigen endogen prozessieren und Peptidfragmente präsentieren.

Des Weiteren wurde mittels eines Chrom-Freisetzungstestes untersucht, ob der TCR-3825 zusätzlich zu der spezifischen Erkennung seines Antigens via IFN- γ -Sekretion auch eine Antigen-spezifische Zytotoxizität vermittelt. Dabei hat sich gezeigt, dass sowohl Peptid-beladene Zielzellen (T2-Zellen), als auch das natürliche Antigen exprimierende Zielzellen spezifisch lysiert werden. Selbst bei einem sehr geringen Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen (1,87:1) wurden noch mehr als die Hälfte (53%) der Peptid-beladenen Zielzellen spezifisch lysiert, was wiederum einen Hinweis auf die hohe Affinität dieses T-Zell-Rezeptors bezüglich seines Antigens liefert.

1.4.1 Spezifität des TCR-3825 und mögliche Risiken für den adoptiven T-Zell-Transfer

Die Spezifität eines TCR, welcher im Rahmen eines adoptiven T-Zell-Transfers, transgen in die T-Zellen von Patienten eingebracht werden soll, ist von ganz herausragender Bedeutung. Unter „On-Target“-Toxizität versteht man die durch einen TCR vermittelte Toxizität, obwohl der TCR nur das spezifische Epitop seines Antigens erkennt. Die Toxizität kommt dadurch zustande, wenn das Antigen nicht nur im Tumorgewebe, sondern auch in Normalgeweben exprimiert wird, wodurch es dann zu schweren Nebenwirkungen kommen kann. Dies wurde unter anderem beim adoptiven Transfer MART-1-spezifischer T-Zellen (Palmer et al., 2008; Johnson et al., 2009) und CEA-spezifischer T-Zellen (Parkhurst, 2011) beobachtet.

Auch die spezifische Erkennung des Epitops, welches jedoch nicht nur durch das eigentliche Antigen exprimiert wird, kann zur „On-Target“-Toxizität führen.

Unter „Off-Target“-Toxizität versteht man die Kreuzreaktivität eines TCR mit einer anderen antigenen Struktur als seinem eigentlichen Epitop. Während nur wenige Fälle bekannt sind, bei denen ein TCR dem Epitop nicht homologe Strukturen erkennt (Basu et al., 2000; Adams et al., 2011; Birnbaum et al., 2014), wird die Kreuzreaktivität, oder auch Polyspezifität (Wucherpfennig et al., 2007), eines TCR mit seinem Epitop homologen Peptid-Liganden deutlich öfter beobachtet. Bei Studien von Morgan et al. (2013) mit Melanom Patienten, die mit einem MAGE-A3-spezifischen TCR behandelt wurden, kam es durch Kreuzreaktivität mit MAGE-A9- und MAGE-A12-exprimierenden Neuronen im Gehirn zu einer starken „On“- und „Off-Target“-Toxizität. Wie von Cameron et al. (2013) und Linette et al. (2013) beschrieben, kam es durch Kreuzreaktivität eines anderen MAGE-A3-spezifischen TCR mit dem im Herzmuskel exprimierten Protein Titin (3 Aminosäuren Abweichung vom eigentlichen MAGE-A3-Epitop) zu schwerer Kardiotoxizität mit Todesfolge bei zwei behandelten Myelom- bzw. Melanom-Patienten. Auch durch Fehlpaarung eines exogenen TCR mit den TCR α/β -Ketten eines endogenen TCR kann es durch die Entstehung völlig neuer TCR-Spezifitäten zur Kreuzreaktivität mit absolut unbekannten antigenen Strukturen kommen (Schumacher, 2002; Schmitt et al., 2009; Van Loenen et al.,

2010; Aggen et al., 2012)

Während also die „On-Target“-Toxizität eines TCR von der Expression des Antigens bzw. des T-Zell-Epitops abhängig ist, hängt eine mögliche „Off-Target“-Toxizität von der Spezifität des T-Zell-Rezeptors ab.

Um nun die Spezifität des hier beschriebenen T-Zell-Rezeptors genauer zu untersuchen, wurde der TCR-3825 zunächst auf Erkennung von 120 Peptiden einer HLA-A2-Selbstpeptid-Bibliothek (Sommermeyer et al., 2013) getestet. Dadurch konnte eine Kreuzreaktivität mit diesen 120 der am häufigsten von humanem HLA-A2 präsentierten Selbstpeptide ausgeschlossen werden. Des Weiteren wurde der TCR-3825 an mehreren, seinem Epitop sehr ähnlichen Peptiden (zwei bis drei Aminosäuren Abweichung) getestet, welche mit Hilfe der Expitop-Datenbank (<http://webclu.bio.wzw.tum.de/expitope/>) identifiziert werden konnten. Dabei zeigte sich eine deutliche Kreuz-Erkennung eines Peptids des CSE1L-Proteins (CSE1L: Chromosome-Segregation-1-Like-Protein; auch CAS: Cellular Apoptosis Susceptibility-Protein), mit zwei abweichenden Aminosäuren in der Peptidsequenz (PLLQSLIGL anstelle von SLLQHLIGL). Laut Kuntay et al. (1997) und Ullmann et al. (1997) handelt es sich bei diesem Protein um einen Export-Faktor, welcher für den Re-Export von Importin- α aus dem Zellkern ins Zytoplasma zuständig ist. Importin- α und Importin- β sind normalerweise als Heterodimer für den Import von Proteinen aus dem Zytoplasma in den Zellkern zuständig, welche ein sogenanntes „Nuclear localization signal“ (NLS) tragen. Außerdem spielt CSE1L zusätzlich als Checkpoint-Protein im Zell-Zyklus eine direkte oder indirekte Rolle bezüglich Zell-Wachstum und Apoptose (Brinkmann et al. 1998; Wellmann, 1997; Behrens et al., 2003). Obwohl die genaue Funktion dieses Proteins noch nicht bekannt ist, wird es in vielen Tumorgeweben exprimiert und als sekretorisches Protein kann es als prognostischer Marker für stark invasive, metastasierende Tumorerkrankungen herangezogen werden (Tung, 2009). Das CSE1L-Protein wird jedoch auch in Normalgeweben, vor allem in stark proliferierenden Geweben, z.T. hoch exprimiert (Brinkmann et al., 1999). Daher ist eine Kreuzreaktivität des TCR-3825 mit dem CSE1L-Peptid äußerst kritisch zu bewerten und muss zukünftig sehr genau untersucht werden. Auf jeden Fall hat sich gezeigt, welch überaus großen Wert die „Expitop“-Datenbank besitzt, um mögliche Kreuzreaktivitäten eines TCR zu untersuchen.

1.4.2 Zukünftige Analysen bzgl. Spezifität und potentieller Toxizität des TCR-3825

Zum einen müssen qualitative und quantitative CSE1L-Expressionsanalysen auf RNA- und Protein-Ebene durchgeführt werden, um möglichst detaillierte Kenntnisse über die Gewebeexpression von CSE1L zu erlangen. Dies soll mit Hilfe des Nano-String nCounter Gen-Expressions-Systems durchgeführt werden. Dabei handelt es sich um eine Technologie, bei der mittels farbkodierter Oligonukleotide komplementäre mRNA-Transkripte eingefangen und quantifiziert werden können (Geiss et al., 2008). Dadurch können die mRNA-Expressions-Level eines Antigens direkt, und ohne jegliche enzymatische Reaktionen bestimmt werden (Payton et al., 2009; Kulkarni, 2011).

Des Weiteren muss untersucht werden, ob das CSE1L-Peptid natürlicherweise prozessiert und präsentiert wird, ob es sich also um ein potentielles T-Zell-Epitop handelt. Die Affinität des PLL-Peptids zum humanem MHC-Molekül HLA-A*02:01 ist deutlich geringer als die des Original-Epitops „SLL“ zum MHC-Molekül (IEDB: MHC IC₅₀ von 715 nM (PLLQSLIGL) anstelle von 20 nM (SLLQHLLIGL); Syfpeithi: Score von 24 (PLLQSLIGL) anstelle von 29 (SLLQHLLIGL)). Das könnte auf eine weniger gute Präsentation dieses Peptids durch Antigen-präsentierende Zellen und somit auf eine weniger gute Stimulation spezifischer T-Zellen hindeuten. Des Weiteren wird das CSE1L-Protein (und damit das PLLQSLIGL-Peptid) auch in der Maus exprimiert. Da der kreuzreaktive TCR-3825 aus einer gesunden Maus mit einem hohen Anteil TCR-3825-exprimierender T-Zellen (>15% TCR-3825 exprimierende CD8⁺ T-Zellen) isoliert wurde, bei der keinerlei Symptome einer Autoimmunerkrankung beobachtet wurden, scheint eine Immundominanz des PLL-Peptides (zumindest im murinen System) eher unwahrscheinlich.

Um sich darüber Klarheit zu verschaffen, muss das CSE1L-Protein in verschiedenen Zielzellen exprimiert werden. Dazu können z.B. mLCL und DC mit für das CSE1L-Protein kodierender *ivt*-RNA transfiziert werden, um eine spezifische Erkennung des natürlicherweise prozessierten und präsentierten Proteins durch den TCR-3825 zu untersuchen. Sollten diese Untersuchungen auf ein hohes, zu erwartendes Risiko für toxische Nebenwirkungen bei behandelten Krebspatienten hindeuten, so wäre dies ein klares Ausschlusskriterium für den

PRAME-spezifischen TCR-3825 für den adoptiven T-Zell-Transfer.

Kessler et al. (2001) konnten bereits zeigen, dass gegen das PRAME-Peptid SLLQHLIGL aufgrund seiner Immundominanz spezifische T-Zellen generiert werden können. Für dieses PRAME-Epitop spezifische, allo-HLA-A2-restringierte und somit hoch affine T-Zellen (Klon HSS1: TRAV8-1 und TRBV9) konnten bereits durch Amir et al. (2011) aus einem AML-Patienten isoliert werden. Der dabei isolierte T-Zell-Rezeptor wurde auf seine Eignung als Kandidat für den adoptiven T-Zell-Transfer getestet. Seine Spezifität wurde an verschiedenen Tumorzelllinien und Normalgeweben getestet, wobei eine spezifische Erkennung PRAME-exprimierender DC und Nieren-Epithel-Zellen beobachtet wurde. Die Erkennung des natürlichen PRAME-Antigens auf der Oberfläche maturer Dendritischer Zellen konnte auch im Rahmen dieser Arbeit hier beobachtet werden.

Um die Risiken einer möglichen „On-Target“-Toxizität abschätzen zu können, soll auch die Expression des PRAME-Antigens, sowohl in Tumor- als auch Normalgeweben mit Hilfe der Nanostring nCounter Technologie genauestens untersucht werden.

Des Weiteren könnten sich präklinische in-vivo Versuche als äußerst wertvoll erweisen, um mögliche durch den TCR-3825 vermittelte „On“- und „Off“-Toxizitäten besser abschätzen zu können. Der Transfer TCR-3825 transgener T-Zellen in HLA-A2-transgene NSG-Mäuse könnte wichtige Informationen zur Gewebetoxizität liefern. Durch Verwendung sowohl stabil TCR-3825-transduzierter, als auch transient TCR-3825-transfizierter T-Zellen für den adoptiven Transfer könnte zusätzlich untersucht werden, ob eine möglicherweise vorhandene Toxizität durch die transiente TCR-Expression vermindert, abgeschwächt oder gar vermieden werden kann.

Durch Transfer TCR-transgener T-Zellen in Tumor-tragende, NSG-Mäuse (Straetemans, 2012; Spranger et al., 2012) könnte zusätzlich eine TCR-3825 vermittelte Regression PRAME-exprimierender Tumoren untersucht werden.

Mittlerweile gibt es verschiedenste Sicherheitsvorkehrungen, um die Risiken durch TCR-genmodifizierte T-Zellen für die Patienten zu minimieren. So wurden zum Beispiel sog. „Selbstmord-Gene“ wie die vom Herpes-Simplex-Virus stammende Thymidin-Kinase (Bonini et al., 1997; Ciceri et al., 2007) in bestimmte T-Zellen eingebracht, welche daraufhin selektiv wieder eliminiert

werden konnten. Ein weiteres Selbstmord-Gen ist das humane Oberflächenmolekül CD20. Nach Transduktion bestimmter T-Zell-Populationen mit dem CD20-Gen können diese CD20⁺ Zellen mit dem CD20-spezifischen Antikörper Rituximab (Introna et al., 2000; Serafini et al., 2004; Van Loenen et al., 2013) gezielt eliminiert werden. Auch die Einführung eines humanen c-myc-Proteins in die TCR-Sequenz transgener T-Zell-Rezeptoren und anschließende Eliminierung dieser c-myc-TCR mittels eines c-myc-spezifischen Antikörpers (Kieback et al., 2008) stellt eine ähnliche Sicherheitsvorkehrung dar. Die Verwendung eines solchen Sicherheits-Mechanismus sollte auf jeden Fall auch für den TCR-3825 in Betracht gezogen und evaluiert werden.

1.5 Weiterer Ausblick und Resümee

Durch die erfolgreiche Transduktion von Effektorzellen mit TCR-3825-kodierenden, retroviralen MP71-Vektoren, wurde eine stabile Expression des TCR über längere Zeit ermöglicht. Selbst wenn der TCR-3825 als TCR für den adoptiven T-Zell-Transfer ausscheiden sollte, so können die TCR-3825 transgenen T-Zellen als Testsystem für PRAME-exprimierende DC verwendet werden, welche als DC-Vakzine eingesetzt werden sollen, um Antigen-spezifische T-Zellen in Patienten zu induzieren. Die Erkennung PRAME-transfizierter DC deutlich über das durch die endogene PRAME-Expression bedingte Niveau hinaus, konnte nachgewiesen werden. Durch diese endogene PRAME-Expression in maturen dendritischen Zellen und in Nieren-Epithel-Zellen werden PRAME-spezifische T-Zellen mit effektiven, reaktiven TCR möglicherweise negativ selektiert (Amir et al., 2011). Ob eine erfolgreiche Induktion Tumor-reaktiver T-Zellen durch PRAME-überexprimierende DC daher möglich ist, bleibt abzuwarten.

Bezüglich des PRAME-spezifischen T-Zell-Rezeptors 3825 lässt sich abschließend sagen, dass es sich um einen durchaus vielversprechenden Kandidaten für den adoptiven T-Zell-Transfer handelt. TCR-3825 gehört zu den wenigen isolierten, hoch affinen T-Zell-Rezeptoren, deren Sequenz zur Affinitäts-Steigerung nicht künstlich modifiziert werden musste. Auch das PRAME-Antigen

stellt aufgrund seiner Expression in vielen verschiedenen Tumorgeweben ein vielversprechendes Zielantigen dar. Nichtsdestotrotz muss die Kreuzreaktivität mit dem CSE1L-Protein genauestens abgeklärt bzw. ausgeschlossen werden, und die Expression von CSE1L und PRAME in Normalgeweben und einem HLA-A2-transgenen Mausmodell muss untersucht werden. Je nachdem, wie zufriedenstellend diese zukünftigen Untersuchungen ausfallen werden, wird es eine klare „Go/No-Go“-Entscheidung bezüglich der weiteren präklinischen und klinischen Untersuchungen zum adoptiven T-Zell-Transfers mit TCR-3825 transgenen T-Zellen geben.

Die Isolierung zweier weiterer TCR-Sequenzen und die bereits erfolgreich durchgeführte Re-Expression des PSMA-spezifischen TCR-3822 haben zudem bestätigt, dass die Isolierung humaner T-Zell-Rezeptoren aus ABabDII-Mäusen sowohl möglich als auch durchführbar ist. Für den TCR-3822 konnte bereits die HLA-A2-restringierte Erkennung des PSMA-Peptids ALFDIESKV als T-Zell-Epitop bestätigt werden. Nun muss dieser TCR zukünftig in gleichem Umfang bezüglich Spezifität, Affinität und möglicher Kreuzreaktivitäten charakterisiert werden, um seine Eignung als Kandidat für den adoptiven T-Zell-Transfer zu evaluieren. Mittels kombinatorischer Re-Expression der TCR-Sequenzen aus den STEAP- und PSCA-immunisierten Mäusen, können hoffentlich noch weitere Antigen-spezifische TCR identifiziert werden.

Die Isolierung dieser T-Zell-Rezeptoren hat zudem verdeutlicht, dass das von Li et al. entwickelte ABabDII-Mausmodell ein äußerst wertvolles Werkzeug zur Identifizierung humaner T-Zell-Rezeptoren aus einem für humane Selbstpeptide naiven T-Zell-Pool darstellt.

Da es für viele Krebserkrankungen bisher nur unzureichende Behandlungsmethoden gibt, eröffnen neue immuntherapeutische Ansätze in Form von DC-Vakzinen und adoptiv transferierten T-Zellen ganz neue Möglichkeiten. Denn trotz der Vielzahl an vorhandenen Krebs-Medikamenten und Behandlungsmethoden, führt eine Krebserkrankung immer noch für viele der betroffenen Patienten vorzeitig zum Tod. Daher sollte die Forschungsgemeinde trotz der mit den Immuntherapien verbundenen Risiken keine Scheu haben, diese vielversprechenden Therapiemöglichkeiten stetig weiter voran zu treiben.

V ZUSAMMENFASSUNG

Charakterisierung Antigen-spezifischer T-Zellen nach Induktion in TCR-humanisierten Mäusen

Für viele Krebserkrankungen gibt es bis zum heutigen Tag keine effektiven Behandlungsmethoden, wodurch die Tür für neue Therapieansätze aufgestoßen wurde. In den letzten zwei Jahrzehnten wurde insbesondere auf dem Gebiet der Immuntherapien zur Behandlung von Krebspatienten intensive Forschung betrieben. Ziel dieser Forschung ist es, das Immunsystem eines Krebspatienten so zu beeinflussen, dass es effektiv körpereigene Tumorzellen erkennen und eliminieren kann.

Zytotoxische T-Zellen sind diejenigen Zellen des menschlichen Immunsystems mit dem größten Potenzial zur Tumorbekämpfung. Aufgrund des Prozesses der negativen Selektion während der Entwicklung der T-Zellen im Thymus, werden jedoch T-Zellen mit solchen T-Zell-Rezeptoren eliminiert, welche hochaffin für tumorassoziierte Antigene sind und somit die Tumorzellen am effektivsten erkennen und bekämpfen könnten. Im Rahmen des adoptiven T-Zell-Transfers können die T-Zellen eines Krebspatienten nun mit neuen, hochaffinen TCR ausgestattet werden, welche spezifisch genau diejenigen Antigene erkennen, die vom Tumor eines Patienten exprimiert werden. Eine der größten Schwierigkeiten stellt dabei die Induktion und Generierung dieser T-Zell-Rezeptoren dar, die im Rahmen des adoptiven T-Zell-Transfers verwendet werden können. Diese Rezeptoren sollen hochaffin für ihr Antigen und dabei absolut spezifisch für ihr Epitop sein. Außerdem sollte dieses Epitop von einem Antigen stammen, das möglichst nur von den Tumorzellen, nicht jedoch von gesunden Geweben exprimiert wird, um mögliche lebensbedrohliche Autoimmun-Reaktionen zu verhindern.

Durch die Entwicklung des ABabDII-Mausmodells, welches für die kompletten humanen TCR α/β -Genloci und humanes HLA-A2 transgen ist, wurde von der Arbeitsgruppe um Prof. Thomas Blankenstein in Berlin die Möglichkeit geschaffen, hochaffine TCR gegen humane Antigene aus einem naiven T-Zell-Rezeptor-Repertoire zu isolieren.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden diese TCR-humanisierten Mäuse verwendet, um hochaffine TCR gegen humane Selbstpeptide zu generieren, die geeignete Ziel-Antigene für eine T-Zell-vermittelte Anti-Tumor-Immunreaktion darstellen, und zwar im Hinblick auf eine mögliche Verwendung zur T-Zell-basierten Immuntherapie von Patienten mit Hormon-refraktärem Prostatakrebs. Es wurden geeignete Prostatakrebs-assoziierte Ziel-Antigene und potenzielle T-Zell-Epitope identifiziert, welche dann für die Peptid-Immunisierung der Mäuse verwendet wurden. Die gegen diese Antigene induzierten, spezifischen T-Zellen wurden isoliert und die jeweiligen TCR-Sequenzen identifiziert.

Es wurden TCR-Sequenzen aus PSMA-, PRAME-, STEAP- und PSCA-spezifischen T-Zellen isoliert. Dabei konnten die zusammengehörigen TCR α/β -Ketten von drei TCR direkt identifiziert werden.

Der aus einer mit dem PRAME-Peptid immunisierten Maus isolierte TCR-3825 wurde dann mittels Re-Expressionsanalysen bezüglich seiner Affinität und Spezifität genauer charakterisiert, um die Eignung dieses Rezeptors als möglichen Kandidaten für den adoptiven T-Zell-Transfer zu untersuchen. Dabei hat sich gezeigt, dass es sich bei dem isolierten TCR tatsächlich um einen hochaffinen, HLA-A2-restringierten TCR handelt, der das von dem PRAME-Antigen stammende Peptid SLLQHLIGL erkennt. Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass das Epitop dieses Rezeptors natürlicherweise prozessiert und sowohl von Tumorzellen als auch von DC auf der Oberfläche präsentiert wird, was von TCR-3825 transgenen T-Zellen erkannt wird. Diese Erkennung führt sowohl zur Stimulierung und Aktivierung der TCR-3825 transgenen T-Zellen, als auch zur spezifischen, T-Zell-vermittelten Lyse PRAME-exprimierender Zielzellen. Bei genaueren Untersuchungen zur Spezifität des TCR-3825 zeigte sich eine Kreuzreaktivität des Rezeptors mit einem seinem Epitop ähnlichen Peptid, welches von dem ubiquitär verbreiteten CSE-1L-Protein stammt. Die Kreuzreaktivität dieses ansonsten vielversprechenden Rezeptors muss im Hinblick auf mögliche „Off-Target“-Toxizitäten genauestens untersucht werden.

Nichtsdestotrotz konnte im Rahmen dieser Arbeit der Wert des ABAbDII-Mausmodells zur Generierung hochaffiner, für humane Selbstpeptide spezifischer, TCR unter Beweis gestellt werden. Die Methoden zur erfolgreichen Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung *in-vivo* induzierter T-Zell-Rezeptoren konnten für dieses Maussystem erfolgreich etabliert werden.

VI SUMMARY

Characterization of Antigen specific T cells after induction in TCR-humanized mice

Until today, there's still no cure for most of the patients with advanced cancer diseases. Due to the lack of effective methods for cancer treatment, the door has been opened for new therapy modalities. During the last two decades, there has been intensive research in the field of immunotherapies to treat cancer patients. The goal is, to recruit the immune system to effectively target the patients own tumor cells.

Cytotoxic T lymphocytes are those cells of the human immune system with the greatest potential to effectively fight tumors. Due to the process of negative selection during T cell development, T cells with high-affinity TCRs that recognize many tumor-associated antigens are eliminated, paring the peripheral repertoire of T cells that can most effectively fight tumor cells.

A major challenge for adoptive cell therapy (ACT) is the induction and generation of T cell clones bearing TCRs, which confer high affinity for their recognized antigen and high specificity for their epitope. Furthermore, the specific epitope should originate from an antigen primarily expressed by tumor cells, but not by healthy tissues, to prevent life-threatening autoimmune reactions.

The ABAbDII mouse model, which is transgenic for the human TCR α/β gene loci und human HLA-A2, expresses a full repertoire of human TCRs and provides a unique resource to acquire T cells with TCRs of appropriate specificity. It provides a new possibility to isolate high-affinity TCRs specific for human self-peptides from a naïve T cell receptor repertoire.

We used these TCR-humanized mice to generate high-affinity TCRs specific for various human self-peptides, which may represent suitable target-antigens for T cells and corresponding TCRs with potential for ACT in patients with hormone refractory prostate cancer. Peptide epitopes of selected prostate cancer-associated target antigens were identified and used for immunization of ABAbDII mice. Specific T cells induced against the four prostate cancer-associated antigens PRAME, STEAP, PSMA and PSCA were isolated and TCR sequences were

identified.

TCR-3825, isolated out of a PRAME-immuized mouse, was characterized after re-expression analyses with respect to TCR peptide sensitivity and fine specificity to evaluate it's applicability as candidates for ACT.

The natural processing of the recognized epitope was demonstrated in tumor cell lines as well as on the surface of Dendritic Cells. Recognition caused stimulation and activation of TCR-3825 transgenic T cells as well as specific, T cell-mediated lysis of antigen-expressing target cells. In-depth investigations regarding TCR specificity were performed to reveal cross-reactivity of TCR-3825 with a CSE-1L derived peptide, showing a two amino acid mismatch compared to the original epitope. Since CSE-1L is a ubiquitously expressed protein, further investigations are urgently required to exclude possible "off-target" toxicities.

Nevertheless, this work gives proof of the enormous potential and value of the TCR-humanized ABabDII-mice as a tool to generate high-affinity human TCRs, specific for self-derived human peptides.

VII ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<u>3d mDC</u>	Mature 3-Tages DC
<u>APC</u>	Antigen präsentierende Zelle (Antigen presenting cell)
<u>AK</u>	Antikörper
<u>CaP</u>	Prostatakrebs (Cancer of Prostate)
<u>CD</u>	Differenzierungscluster (Cluster of Differentiation)
<u>cDNA</u>	Komplementäre DNS (complementary DNA)
<u>CDR</u>	Complementary Determining Region
<u>CTL</u>	Zytotoxischer T-Lymphozyt (Cytotoxic T Lymphocyte)
<u>CTLA-4</u>	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
<u>DC</u>	Dendritische Zelle (Dendritic Cell)
<u>dest.</u>	Destilliert
<u>DMSO</u>	Dimethylsulfoxid
<u>DANN</u>	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleid Acid)
<u>dNTP</u>	Desoxynukleotid-5-Trisphosphat
<u>CTA</u>	Tumor-Testis Antigen (Cancer-Testis Antigen)
<u>ELISA</u>	Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay
<u>EPCAM</u>	Epithelial Cellular Adhesion Molecule
<u>F</u>	Farad
<u>FACS</u>	Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer (fluorescence act. cell sorter)
<u>FCS</u>	Fötales Kälserum (Fetal Calf Serum)
<u>FITC</u>	Fluoreszein-Isothiozyanat
<u>FSC</u>	Vorwärtsstreuung (Forward Scatter)
<u>GM-CSF</u>	Granulozyten-Makrophagenkolonie-stimulierender Faktor
<u>HLA</u>	Humanes Leukozyten-Antigen
<u>HS</u>	Humanserum
<u>iDC</u>	immature Dendritische Zellen (immature Dendritic Cell)
<u>IFN</u>	Interferon
<u>Ig</u>	Immunglobulin
<u>IL</u>	Interleukin
<u>ivt-RNA</u>	<i>in-vitro</i> transkribierte RNA
<u>J-Segment</u>	verbindendes Segment (Joining Segment)
<u>LB-Medium</u>	Luria-Bertani-Medium

<u>LCL</u>	Lymphoblastoide B-Zell-Linie (Lymphlastoide Cell Line)
<u>MAGE</u>	Melanom-Antigen-Familie
<u>MART-1</u>	Melanoma Antigen Recognized by T-cells 1
<u>mDC</u>	mature DC (mature Dendritic Cell)
<u>MFI</u>	Mittlere Fluoreszenzintensität
<u>MHC</u>	Haupthistocompatibilitätskomplex (major histocompat. complex)
<u>mLCL</u>	Mini-EBV transformierte LCL
<u>NY-ESO</u>	New York Esophageal Squamous Cancer Antigen
<u>OD_x</u>	Optische Dichte der Wellenlänge x nm
<u>ORF</u>	offener Leserahmen (Open Reading Frame)
<u>PAP</u>	Prostatic Acid Phosphatase
<u>PBL</u>	Periphere Blut-Lymphozyten
<u>PBMC</u>	Periphere mononukleäre Blutzellen (periph. blood mononuclear cells)
<u>PBS</u>	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline)
<u>PCR</u>	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain rReaction)
<u>PCTA</u>	Prostate Carcinoma Tumour Antigen
<u>PD-1</u>	Programmed Cell Death Protein 1
<u>PE</u>	Phycoerythrin
<u>PFA</u>	Paraformaldehyd
<u>PGE₂</u>	Prostaglandin E ₂
<u>PRAME</u>	Preferentially expressed Antigen in Melanoma
<u>PSCA</u>	Prostate Stem Cell Antigen
<u>PSGR</u>	Prostate-Specific G Protein-Coupled Receptor
<u>PSMA</u>	Prostate Specific Membrane Antigen
<u>PTH-rP</u>	Parathyroid Hormone-related Protein
<u>RNA</u>	Ribonukleinsäure (Ribonucleic Acid)
<u>RPMI</u>	Rosewell Park Memorial Institute Medium 1640
<u>SSC</u>	Seitwärtsstreuung (Sideward Scatter)
<u>STEAP</u>	Six-Transmembrane Epithelial Antigen of Prostate
<u>TAA</u>	Tumor-assoziiertes Antigen
<u>TAE</u>	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
<u>TAP</u>	Transportprotein (Transporter associated with Antigen Processing)
<u>TCR</u>	T-Zell-Rezeptor (T Cell Receptor)
<u>TGF</u>	Transformierender Wachstumsfaktor (Transforming Growth Factor)
<u>T_H</u>	T-Helfer-Zelle
<u>TIL</u>	Tumor-infiltrierender T-Lymphozyt

<u>TLR</u>	Toll-Like-Rezeptor
<u>TNF</u>	Tumornekrosefaktor
<u>V-Segment</u>	variables Segment
<u>VLE</u>	sehr wenig Endotoxin (Very Low Endotoxin)

VII LITERATURVERZEICHNIS

Abate-Daga, D., Lagisetty, K. H., Tran, E., Zheng, Z., Gattinoni, L., Yu, Z., Burns, W. R., Miermont, A. M., Teper, Y., Rudloff, U., *et al.* (2014). A Novel Chimeric Antigen Receptor Against Prostate Stem Cell Antigen Mediates Tumor Destruction in a Humanized Mouse Model of Pancreatic Cancer. Human gene therapy.

Adams, J. J., Narayanan, S., Liu, B., Birnbaum, M. E., Kruse, A. C., Bowerman, N. A., Chen, W., Levin, A. M., Connolly, J. M., Zhu, C., *et al.* (2011). T cell receptor signaling is limited by docking geometry to peptide-major histocompatibility complex. *Immunity* 35, 681-693.

Agarwal, P., Raghavan, A., Nandiwada, S. L., Curtsinger, J. M., Bohjanen, P. R., Mueller, D. L., and Mescher, M. F. (2009). Gene regulation and chromatin remodeling by IL-12 and type I IFN in programming for CD8 T cell effector function and memory. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 183, 1695-1704.

Agata, Y., Kawasaki, A., Nishimura, H., Ishida, Y., Tsubata, T., Yagita, H., and Honjo, T. (1996). Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *International immunology* 8, 765-772.

Aggen, D. H., Chervin, A. S., Schmitt, T. M., Engels, B., Stone, J. D., Richman, S. A., Piepenbrink, K. H., Baker, B. M., Greenberg, P. D., Schreiber, H., and Kranz, D. M. (2012). Single-chain ValphaVbeta T-cell receptors function without mispairing with endogenous TCR chains. *Gene Ther* 19, 365-374.

Alderson, M. R., Smith, C. A., Tough, T. W., Davis-Smith, T., Armitage, R. J., Falk, B., Roux, E., Baker, E., Sutherland, G. R., and Din, W. S. (1994). Molecular and biological characterization of human 4-1BB and its ligand. *European journal of immunology* 24, 2219-2227.

Aleksic, M., Liddy, N., Molloy, P. E., Pumphrey, N., Vuidepot, A., Chang, K. M., and Jakobsen, B. K. (2012). Different affinity windows for virus and cancer-specific T-cell receptors: implications for therapeutic strategies. *European journal of immunology* 42, 3174-3179.

Altman, J. D., Moss, P. A., Goulder, P. J., Barouch, D. H., McHeyzer-Williams, M. G., Bell, J. I., McMichael, A. J., and Davis, M. M. (1996). Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274, 94-96.

Amir, A. L., van der Steen, D. M., van Loenen, M. M., Hagedoorn, R. S., de Boer, R., Kester, M. D., de Ru, A. H., Lugthart, G. J., van Kooten, C., Hiemstra, P. S., *et al.* (2011). PRAME-specific Allo-HLA-restricted T cells with potent antitumor reactivity useful for therapeutic T-cell receptor gene transfer. *Clin Cancer Res* 17, 5615-5625.

Anassi, E., and Ndefo, U. A. (2011). Sipuleucel-T (provenge) injection: the first immunotherapy agent (vaccine) for hormone-refractory prostate cancer. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management* 36, 197-202.

Ansel, K. M., Lee, D. U., and Rao, A. (2003). An epigenetic view of helper T cell differentiation. *Nature immunology* 4, 616-623.

Azuma, M., Cayabyab, M., Buck, D., Phillips, J. H., and Lanier, L. L. (1992). CD28 interaction with B7 costimulates primary allogeneic proliferative responses and cytotoxicity mediated by small, resting T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 175, 353-360.

Banchereau, J., and Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.

Basu, D., Horvath, S., Matsumoto, I., Fremont, D. H., and Allen, P. M. (2000). Molecular basis for recognition of an arthritic peptide and a foreign epitope on distinct MHC molecules by a single TCR. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 164, 5788-5796.

Becker, C., Pohla, H., Frankenberger, B., Schuler, T., Assenmacher, M., Schendel, D. J., and Blankenstein, T. (2001). Adoptive tumor therapy with T lymphocytes enriched through an IFN-gamma capture assay. *Nat Med* 7, 1159-1162.

Behrens, P., Brinkmann, U., and Wellmann, A. (2003). CSE1L/CAS: its role in proliferation and apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 8, 39-44.

Bernard, P., and Couturier, M. (1992). Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol* 226, 735-745.

Bernard, P., Gabant, P., Bahassi, E. M., and Couturier, M. (1994). Positive-selection vectors using the F plasmid ccdB killer gene. *Gene* 148, 71-74.

Berrino, F., De Angelis, R., Sant, M., Rosso, S., Bielska-Lasota, M., Coebergh, J. W., and Santaquilani, M. (2007). Survival for eight major cancers and all cancers

combined for European adults diagnosed in 1995-99: results of the EUROCORE-4 study. *The lancet oncology* 8, 773-783.

Birnbaum, M. E., Mendoza, J. L., Sethi, D. K., Dong, S., Glanville, J., Dobbins, J., Ozkan, E., Davis, M. M., Wucherpfennig, K. W., and Garcia, K. C. (2014). Deconstructing the Peptide-MHC Specificity of T Cell Recognition. *Cell* 157, 1073-1087.

Bolotin, D. A., Mamedov, I. Z., Britanova, O. V., Zvyagin, I. V., Shagin, D., Ustyugova, S. V., Turchaninova, M. A., Lukyanov, S., Lebedev, Y. B., and Chudakov, D. M. (2012). Next generation sequencing for TCR repertoire profiling: platform-specific features and correction algorithms. *European journal of immunology* 42, 3073-3083.

Bonini, C., Ferrari, G., Verzeletti, S., Servida, P., Zappone, E., Ruggieri, L., Ponzoni, M., Rossini, S., Mavilio, F., Traversari, C., and Bordignon, C. (1997). HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* 276, 1719-1724.

Brentjens, R. J., Davila, M. L., Riviere, I., Park, J., Wang, X., Cowell, L. G., Bartido, S., Stefanski, J., Taylor, C., Olszewska, M., *et al.* (2013). CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Science translational medicine* 5, 177ra138.

Brill, T. H., Kubler, H. R., Pohla, H., Buchner, A., Fend, F., Schuster, T., van Randenborgh, H., Paul, R., Kummer, T., Plank, C., *et al.* (2009). Therapeutic vaccination with an interleukin-2-interferon-gamma-secreting allogeneic tumor vaccine in patients with progressive castration-resistant prostate cancer: a phase I/II trial. *Human gene therapy* 20, 1641-1651.

Brill, T. H., Kubler, H. R., von Randenborgh, H., Fend, F., Pohla, H., Breul, J., Hartung, R., Paul, R., Schendel, D. J., and Gansbacher, B. (2007). Allogeneic retrovirally transduced, IL-2- and IFN-gamma-secreting cancer cell vaccine in patients with hormone refractory prostate cancer--a phase I clinical trial. *J Gene Med* 9, 547-560.

Brinkmann, U. (1998). CAS, the human homologue of the yeast chromosome-segregation gene CSE1, in proliferation, apoptosis, and cancer. *American journal of human genetics* 62, 509-513.

Brinkmann, U., Brinkmann, E., Bera, T. K., Wellmann, A., and Pastan, I. (1999). Tissue-specific alternative splicing of the CSE1L/CAS (cellular apoptosis susceptibility) gene. *Genomics* 58, 41-49.

Burch, P. A., Breen, J. K., Buckner, J. C., Gastineau, D. A., Kaur, J. A., Laus, R. L., Padley, D. J., Peshwa, M. V., Pitot, H. C., Richardson, R. L., *et al.* (2000). Priming tissue-specific cellular immunity in a phase I trial of autologous dendritic cells for prostate cancer. *Clin Cancer Res* 6, 2175-2182.

Cameron, B. J., Gerry, A. B., Dukes, J., Harper, J. V., Kannan, V., Bianchi, F. C., Grand, F., Brewer, J. E., Gupta, M., Plesa, G., *et al.* (2013). Identification of a Titin-derived HLA-A1-presented peptide as a cross-reactive target for engineered MAGE A3-directed T cells. *Science translational medicine* 5, 197ra103.

Carreno, B. M., Becker-Hapak, M., Huang, A., Chan, M., Alyasiry, A., Lie, W. R., Aft, R. L., Cornelius, L. A., Trinkaus, K. M., and Linette, G. P. (2013). IL-12p70-producing patient DC vaccine elicits Tc1-polarized immunity. *The Journal of clinical investigation* 123, 3383-3394.

Chambers, C. A., Kuhns, M. S., Egen, J. G., and Allison, J. P. (2001). CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annual review of immunology* 19, 565-594.

Cheever, M. A., Allison, J. P., Ferris, A. S., Finn, O. J., Hastings, B. M., Hecht, T. T., Mellman, I., Prindiville, S. A., Viner, J. L., Weiner, L. M., and Matrisian, L. M. (2009). The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin Cancer Res* 15, 5323-5337.

Chen, W., and McCluskey, J. (2006). Immunodominance and immunodomination: critical factors in developing effective CD8+ T-cell-based cancer vaccines. *Advances in cancer research* 95, 203-247.

Chen, Y. T., Scanlan, M. J., Sahin, U., Tureci, O., Gure, A. O., Tsang, S., Williamson, B., Stockert, E., Pfreundschuh, M., and Old, L. J. (1997). A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 1914-1918.

Chenchick, A. et al. (1998). Generation and use of high-quality cDNA from small amounts of total RNA by SMART PCR. *Biotechniques Books*, MA Ch 22.

Ciceri, F., Bonini, C., Marktel, S., Zappone, E., Servida, P., Bernardi, M., Pescarollo, A., Bondanza, A., Peccatori, J., Rossini, S., *et al.* (2007). Antitumor effects of HSV-TK-engineered donor lymphocytes after allogeneic stem-cell transplantation. *Blood* 109, 4698-4707.

Cludts, S., Decaestecker, C., Mahillon, V., Chevalier, D., Kaltner, H., Andre, S.,

Remmelink, M., Leroy, X., Gabius, H. J., and Saussez, S. (2009). Galectin-8 up-regulation during hypopharyngeal and laryngeal tumor progression and comparison with galectin-1, -3 and -7. *Anticancer research* 29, 4933-4940.

Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G., and Ravetch, J. V. (2000). Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 6, 443-446.

Cole, D. K., Yuan, F., Rizkallah, P. J., Miles, J. J., Gostick, E., Price, D. A., Gao, G. F., Jakobsen, B. K., and Sewell, A. K. (2009). Germ line-governed recognition of a cancer epitope by an immunodominant human T-cell receptor. *The Journal of biological chemistry* 284, 27281-27289.

Correale, P., Micheli, L., Vecchio, M. T., Sabatino, M., Petrioli, R., Pozzessere, D., Marsili, S., Giorgi, G., Lozzi, L., Neri, P., and Francini, G. (2001). A parathyroid-hormone-related-protein (PTH-rP)-specific cytotoxic T cell response induced by in vitro stimulation of tumour-infiltrating lymphocytes derived from prostate cancer metastases, with epitope peptide-loaded autologous dendritic cells and low-dose IL-2. *British journal of cancer* 85, 1722-1730.

Couzin-Frankel, J. (2013). Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science* 342, 1432-1433.

Crucian, B., Dunne, P., Friedman, H., Ragsdale, R., Pross, S., and Widen, R. (1996). Detection of altered T helper 1 and T helper 2 cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in patients with multiple sclerosis utilizing intracellular cytokine detection by flow cytometry and surface marker analysis. *Clin Diagn Lab Immunol* 3, 411-416.

Curran, K. J., Pegram, H. J., and Brentjens, R. J. (2012). Chimeric antigen receptors for T cell immunotherapy: current understanding and future directions. *J Gene Med* 14, 405-415.

Dash, P., McClaren, J. L., Oguin, T. H., 3rd, Rothwell, W., Todd, B., Morris, M. Y., Becksfort, J., Reynolds, C., Brown, S. A., Doherty, P. C., and Thomas, P. G. (2011). Paired analysis of TCRalpha and TCRbeta chains at the single-cell level in mice. *The Journal of clinical investigation* 121, 288-295.

Dauer, M., Obermaier, B., Herten, J., Haerle, C., Pohl, K., Rothenfusser, S., Schnurr, M., Endres, S., and Eigler, A. (2003). Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 170, 4069-4076.

Davila, M. L., Brentjens, R., Wang, X., Riviere, I., and Sadelain, M. (2012). How

do CARs work?: Early insights from recent clinical studies targeting CD19. *Oncoimmunology* 1, 1577-1583.

de Vries, I. J., Lesterhuis, W. J., Scharenborg, N. M., Engelen, L. P., Ruiter, D. J., Gerritsen, M. J., Croockewit, S., Britten, C. M., Torensma, R., Adema, G. J., *et al.* (2003). Maturation of dendritic cells is a prerequisite for inducing immune responses in advanced melanoma patients. *Clin Cancer Res* 9, 5091-5100.

Delamarre, L., and Mellman, I. (2011). Harnessing dendritic cells for immunotherapy. *Semin Immunol* 23, 2-11.

den Haan, J. M., Lehar, S. M., and Bevan, M. J. (2000). CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *The Journal of experimental medicine* 192, 1685-1696.

Dossinger, G., Bunse, M., Bet, J., Albrecht, J., Paszkiewicz, P. J., Weissbrich, B., Schiedewitz, I., Henkel, L., Schiemann, M., Neuenhahn, M., *et al.* (2013). MHC multimer-guided and cell culture-independent isolation of functional T cell receptors from single cells facilitates TCR identification for immunotherapy. *PloS one* 8, e61384.

Dotti, G., Gottschalk, S., Savoldo, B., and Brenner, M. K. (2014). Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Immunological reviews* 257, 107-126.

Engell-Noerregaard, L., Hansen, T. H., Andersen, M. H., Thor Straten, P., and Svane, I. M. (2009). Review of clinical studies on dendritic cell-based vaccination of patients with malignant melanoma: assessment of correlation between clinical response and vaccine parameters. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII 58, 1-14.

Engels, B., Engelhard, V. H., Sidney, J., Sette, A., Binder, D. C., Liu, R. B., Kranz, D. M., Meredith, S. C., Rowley, D. A., and Schreiber, H. (2013). Relapse or eradication of cancer is predicted by peptide-major histocompatibility complex affinity. *Cancer Cell* 23, 516-526.

Epping, M. T., Wang, L., Edel, M. J., Carlee, L., Hernandez, M., and Bernards, R. (2005). The human tumor antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signaling. *Cell* 122, 835-847.

Fehres, C. M., Unger, W. W., Garcia-Vallejo, J. J., and van Kooyk, Y. (2014). Understanding the Biology of Antigen Cross-Presentation for the Design of Vaccines Against Cancer. *Front Immunol* 5, 149.

Frankenberger, B., and Schendel, D. J. (2012). Third generation dendritic cell vaccines for tumor immunotherapy. *European journal of cell biology* 91, 53-58.

Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L. J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M. C., *et al.* (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *The Journal of experimental medicine* 192, 1027-1034.

Freeman, J. D., Warren, R. L., Webb, J. R., Nelson, B. H., and Holt, R. A. (2009). Profiling the T-cell receptor beta-chain repertoire by massively parallel sequencing. *Genome research* 19, 1817-1824.

Geiss, G. K., Bumgarner, R. E., Birditt, B., Dahl, T., Dowidar, N., Dunaway, D. L., Fell, H. P., Ferree, S., George, R. D., Grogan, T., *et al.* (2008). Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nature biotechnology* 26, 317-325.

Grupp, S. A., Kalos, M., Barrett, D., Aplenc, R., Porter, D. L., Rheingold, S. R., Teachey, D. T., Chew, A., Hauck, B., Wright, J. F., *et al.* (2013). Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *The New England journal of medicine* 368, 1509-1518.

Hamid, O., Robert, C., Daud, A., Hodi, F. S., Hwu, W. J., Kefford, R., Wolchok, J. D., Hersey, P., Joseph, R. W., Weber, J. S., *et al.* (2013). Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *The New England journal of medicine* 369, 134-144.

Harding, F. A., McArthur, J. G., Gross, J. A., Raulet, D. H., and Allison, J. P. (1992). CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 356, 607-609.

Heath, W. R., Belz, G. T., Behrens, G. M., Smith, C. M., Forehan, S. P., Parish, I. A., Davey, G. M., Wilson, N. S., Carbone, F. R., and Villadangos, J. A. (2004). Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunological reviews* 199, 9-26.

Higano, C. S., Schellhammer, P. F., Small, E. J., Burch, P. A., Nemunaitis, J., Yuh, L., Provost, N., and Frohlich, M. W. (2009). Integrated data from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trials of active cellular immunotherapy with sipuleucel-T in advanced prostate cancer. *Cancer* 115, 3670-3679.

Hinrichs, C. S., and Restifo, N. P. (2013). Reassessing target antigens for adoptive T-cell therapy. *Nature biotechnology* 31, 999-1008.

Hinrichs, C. S., and Rosenberg, S. A. (2014). Exploiting the curative potential of adoptive T-cell therapy for cancer. *Immunological reviews* 257, 56-71.

Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J. C., *et al.* (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England journal of medicine* 363, 711-723.

Hofmann, O., Caballero, O. L., Stevenson, B. J., Chen, Y. T., Cohen, T., Chua, R., Maher, C. A., Panji, S., Schaefer, U., Kruger, A., *et al.* (2008). Genome-wide analysis of cancer/testis gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 20422-20427.

Holt, R. A., and Jones, S. J. (2008). The new paradigm of flow cell sequencing. *Genome research* 18, 839-846.

Huber, M. L., Haynes, L., Parker, C., and Iversen, P. (2012). Interdisciplinary critique of sipuleucel-T as immunotherapy in castration-resistant prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 104, 273-279.

Hubert, R. S., Vivanco, I., Chen, E., Rastegar, S., Leong, K., Mitchell, S. C., Madraswala, R., Zhou, Y., Kuo, J., Raitano, A. B., *et al.* (1999). STEAP: a prostate-specific cell-surface antigen highly expressed in human prostate tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 14523-14528.

Ikeda, H., Lethe, B., Lehmann, F., van Baren, N., Baurain, J. F., de Smet, C., Chambost, H., Vitale, M., Moretta, A., Boon, T., and Coulie, P. G. (1997). Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity* 6, 199-208.

Introna, M., Barbui, A. M., Bambacioni, F., Casati, C., Gaipa, G., Borleri, G., Bernasconi, S., Barbui, T., Golay, J., Biondi, A., and Rambaldi, A. (2000). Genetic modification of human T cells with CD20: a strategy to purify and lyse transduced cells with anti-CD20 antibodies. *Human gene therapy* 11, 611-620.

Jacobs, J. J., Snackey, C., Geldof, A. A., Characiejus, D., RJ, V. A. N. M., and W, D. E. N. O. (2014). Inefficacy of Therapeutic Cancer Vaccines and Proposed Improvements. *Casus of Prostate Cancer. Anticancer research* 34, 2689-2700.

Jager, E., Chen, Y. T., Drijfhout, J. W., Karbach, J., Ringhoffer, M., Jager, D., Arand, M., Wada, H., Noguchi, Y., Stockert, E., *et al.* (1998). Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *The Journal of experimental medicine* 187, 265-270.

Jassim, A., Ollier, W., Payne, A., Biro, A., Oliver, R. T., and Festenstein, H. (1989). Analysis of HLA antigens on germ cells in human semen. *European journal of immunology* 19, 1215-1220.

Javorovic, M., Pohla, H., Frankenberger, B., Wolfel, T., and Schendel, D. J. (2005). RNA transfer by electroporation into mature dendritic cells leading to reactivation of effector-memory cytotoxic T lymphocytes: a quantitative analysis. *Mol Ther* 12, 734-743.

Jenkins, M. K. (1994). The ups and downs of T cell costimulation. *Immunity* 1, 443-446.

Jensen, M. C., and Riddell, S. R. (2014). Design and implementation of adoptive therapy with chimeric antigen receptor-modified T cells. *Immunological reviews* 257, 127-144.

Joffre, O. P., Segura, E., Savina, A., and Amigorena, S. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. *Nature reviews Immunology* 12, 557-569.

Johnson, L. A., Morgan, R. A., Dudley, M. E., Cassard, L., Yang, J. C., Hughes, M. S., Kammula, U. S., Royal, R. E., Sherry, R. M., Wunderlich, J. R., *et al.* (2009). Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood* 114, 535-546.

Jonuleit, H., Kuhn, U., Muller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L., Schmitt, E., Knop, J., and Enk, A. H. (1997). Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *European journal of immunology* 27, 3135-3142.

June, C., Rosenberg, S. A., Sadelain, M., and Weber, J. S. (2012). T-cell therapy at the threshold. *Nature biotechnology* 30, 611-614.

Kalos, M., Levine, B. L., Porter, D. L., Katz, S., Grupp, S. A., Bagg, A., and June, C. H. (2011). T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Science translational medicine* 3, 95ra73.

Kammertoens, T., and Blankenstein, T. (2013). It's the peptide-MHC affinity, stupid. *Cancer Cell* 23, 429-431.

Kantoff, P. W., Higano, C. S., Shore, N. D., Berger, E. R., Small, E. J., Penson, D. F., Redfern, C. H., Ferrari, A. C., Dreicer, R., Sims, R. B., *et al.* (2010). Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *The New*

England journal of medicine 363, 411-422.

Karimkhani, C., Gonzalez, R., and Dellavalle, R. P. (2014). A Review of Novel Therapies for Melanoma. American journal of clinical dermatology.

Kershaw, M. H., Westwood, J. A., Parker, L. L., Wang, G., Eshhar, Z., Mavroukakis, S. A., White, D. E., Wunderlich, J. R., Canevari, S., Rogers-Freezer, L., *et al.* (2006). A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. Clin Cancer Res 12, 6106-6115.

Kessler, J. H., Beekman, N. J., Bres-Vloemans, S. A., Verdijk, P., van Veelen, P. A., Kloosterman-Joosten, A. M., Vissers, D. C., ten Bosch, G. J., Kester, M. G., Sijts, A., *et al.* (2001). Efficient identification of novel HLA-A(*)0201-presented cytotoxic T lymphocyte epitopes in the widely expressed tumor antigen PRAME by proteasome-mediated digestion analysis. The Journal of experimental medicine 193, 73-88.

Kieback, E., Charo, J., Sommermeyer, D., Blankenstein, T., and Uckert, W. (2008). A safeguard eliminates T cell receptor gene-modified autoreactive T cells after adoptive transfer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105, 623-628.

Kim, S. M., Bhonsle, L., Besgen, P., Nickel, J., Backes, A., Held, K., Vollmer, S., Dornmair, K., and Prinz, J. C. (2012). Analysis of the paired TCR alpha- and beta-chains of single human T cells. PloS one 7, e37338.

Kochenderfer, J. N., Dudley, M. E., Feldman, S. A., Wilson, W. H., Spaner, D. E., Maric, I., Stetler-Stevenson, M., Phan, G. Q., Hughes, M. S., Sherry, R. M., *et al.* (2012). B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. Blood 119, 2709-2720.

Kochenderfer, J. N., Wilson, W. H., Janik, J. E., Dudley, M. E., Stetler-Stevenson, M., Feldman, S. A., Maric, I., Raffeld, M., Nathan, D. A., Lanier, B. J., *et al.* (2010). Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. Blood 116, 4099-4102.

Krummel, M. F., and Allison, J. P. (1995). CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. The Journal of experimental medicine 182, 459-465.

Kulkarni, M. M. (2011). Digital multiplexed gene expression analysis using the NanoString nCounter system. Current protocols in molecular biology Chapter 25, Unit25B.10.

Kunert, A., Straetemans, T., Govers, C., Lamers, C., Mathijssen, R., Sleijfer, S., and Debets, R. (2013). TCR-Engineered T Cells Meet New Challenges to Treat Solid Tumors: Choice of Antigen, T Cell Fitness, and Sensitization of Tumor Milieu. *Front Immunol* 4, 363.

Kurts, C., Cannarile, M., Klebba, I., and Brocker, T. (2001). Dendritic cells are sufficient to cross-present self-antigens to CD8 T cells in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 166, 1439-1442.

Kutay, U., Bischoff, F. R., Kostka, S., Kraft, R., and Gorlich, D. (1997). Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell* 90, 1061-1071.

Kwon, E. D., Drake, C. G., Scher, H. I., Fizazi, K., Bossi, A., van den Eertwegh, A. J., Krainer, M., Houede, N., Santos, R., Mahammedi, H., *et al.* (2014). Ipilimumab versus placebo after radiotherapy in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer that had progressed after docetaxel chemotherapy (CA184-043): a multicentre, randomised, double-blind, phase 3 trial. *The lancet oncology* 15, 700-712.

Lamers, C. H., Sleijfer, S., Vulto, A. G., Kruit, W. H., Kliffen, M., Debets, R., Gratama, J. W., Stoter, G., and Oosterwijk, E. (2006). Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24, e20-22.

Li, L., and Blankenstein, T. (2013). Generation of transgenic mice with megabase-sized human yeast artificial chromosomes by yeast spheroplast-embryonic stem cell fusion. *Nature protocols* 8, 1567-1582.

Li, L. P., Lampert, J. C., Chen, X., Leitao, C., Popovic, J., Muller, W., and Blankenstein, T. (2010a). Transgenic mice with a diverse human T cell antigen receptor repertoire. *Nat Med* 16, 1029-1034.

Li, Y., Cozzi, P. J., and Russell, P. J. (2010b). Promising tumor-associated antigens for future prostate cancer therapy. *Medicinal research reviews* 30, 67-101.

Linette, G. P., and Carreno, B. M. (2013). Dendritic cell-based vaccines: Shining the spotlight on signal 3. *Oncoimmunology* 2, e26512.

Linette, G. P., Stadtmauer, E. A., Maus, M. V., Rapoport, A. P., Levine, B. L., Emery, L., Litzky, L., Bagg, A., Carreno, B. M., Cimino, P. J., *et al.* (2013). Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma. *Blood* 122, 863-871.

Linnemann, C., Heemskerk, B., Kvistborg, P., Kluin, R. J., Bolotin, D. A., Chen, X., Bresser, K., Nieuwland, M., Schotte, R., Michels, S., *et al.* (2013). High-throughput identification of antigen-specific TCRs by TCR gene capture. *19*, 1534-1541.

Lipson, E. J., and Drake, C. G. (2011). Ipilimumab: an anti-CTLA-4 antibody for metastatic melanoma. *Clin Cancer Res 17*, 6958-6962.

Lo, W. L., Solomon, B. D., Donermeyer, D. L., Hsieh, C. S., and Allen, P. M. (2014). T cell immunodominance is dictated by the positively selecting self-peptide. *eLife 3*, e01457.

Lucas, S., and Coulie, P. G. (2008). About human tumor antigens to be used in immunotherapy. *Semin Immunol 20*, 301-307.

Morgan, R. A., Chinnasamy, N., Abate-Daga, D., Gros, A., Robbins, P. F., Zheng, Z., Dudley, M. E., Feldman, S. A., Yang, J. C., Sherry, R. M., *et al.* (2013). Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy. *J Immunother 36*, 133-151.

Morgan, R. A., Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Hughes, M. S., Yang, J. C., Sherry, R. M., Royal, R. E., Topalian, S. L., Kammula, U. S., Restifo, N. P., *et al.* (2006). Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science 314*, 126-129.

Morgan, R. A., Yang, J. C., Kitano, M., Dudley, M. E., Laurencot, C. M., and Rosenberg, S. A. (2010). Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther 18*, 843-851.

Morris, G. P., and Allen, P. M. (2012). How the TCR balances sensitivity and specificity for the recognition of self and pathogens. *Nature immunology 13*, 121-128.

Mosca, P. J., Hobeika, A. C., Clay, T. M., Nair, S. K., Thomas, E. K., Morse, M. A., and Lyerly, H. K. (2000). A subset of human monocyte-derived dendritic cells expresses high levels of interleukin-12 in response to combined CD40 ligand and interferon-gamma treatment. *Blood 96*, 3499-3504.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol 51 Pt 1*, 263-273.

Murphy, K. (2011) Janeway's Immunobiology. Taylor & Francis; 8th edition.

Novellino, L., Castelli, C., and Parmiani, G. (2005). A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII 54, 187-207.

Palmer, D. C., Chan, C. C., Gattinoni, L., Wrzesinski, C., Paulos, C. M., Hinrichs, C. S., Powell, D. J., Jr., Klebanoff, C. A., Finkelstein, S. E., Fariss, R. N., *et al.* (2008). Effective tumor treatment targeting a melanoma/melanocyte-associated antigen triggers severe ocular autoimmunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 8061-8066.

Park, J. R., Digiusto, D. L., Slovak, M., Wright, C., Naranjo, A., Wagner, J., Meechoovet, H. B., Bautista, C., Chang, W. C., Ostberg, J. R., and Jensen, M. C. (2007). Adoptive transfer of chimeric antigen receptor re-directed cytolytic T lymphocyte clones in patients with neuroblastoma. *Mol Ther* 15, 825-833.

Parkhurst, M. R., Joo, J., Riley, J. P., Yu, Z., Li, Y., Robbins, P. F., and Rosenberg, S. A. (2009). Characterization of genetically modified T-cell receptors that recognize the CEA:691-699 peptide in the context of HLA-A2.1 on human colorectal cancer cells. *Clin Cancer Res* 15, 169-180.

Parkhurst, M. R., Yang, J. C., Langan, R. C., Dudley, M. E., Nathan, D. A., Feldman, S. A., Davis, J. L., Morgan, R. A., Merino, M. J., Sherry, R. M., *et al.* (2011). T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis. *Mol Ther* 19, 620-626.

Payton, J. E., Grieselhuber, N. R., Chang, L. W., Murakami, M., Geiss, G. K., Link, D. C., Nagarajan, R., Watson, M. A., and Ley, T. J. (2009). High throughput digital quantification of mRNA abundance in primary human acute myeloid leukemia samples. *The Journal of clinical investigation* 119, 1714-1726.

Picker, L. J., Singh, M. K., Zdraveski, Z., Treer, J. R., Waldrop, S. L., Bergstresser, P. R., and Maino, V. C. (1995). Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry. *Blood* 86, 1408-1419.

Pinto, S., Sommermeyer, D., Michel, C., Wilde, S., Schendel, D., Uckert, W., Blankenstein, T., and Kyewski, B. (2014). Mis-initiation of intrathymic MART-1 transcription and biased TCR usage explain the high frequency of MART-1-specific T cells. *European journal of immunology*.

Porter, D. L., Levine, B. L., Kalos, M., Bagg, A., and June, C. H. (2011). Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *The New England journal of medicine* 365, 725-733.

Raval, R. R., Sharabi, A. B., Walker, A. J., Drake, C. G., and Sharma, P. (2014). Tumor immunology and cancer immunotherapy: summary of the 2013 SITC primer. *Journal for immunotherapy of cancer* 2, 14.

Reuss, S., Biese, P., Cosset, F. L., Takeuchi, Y., and Uckert, W. (2007). Suspension packaging cell lines for the simplified generation of T-cell receptor encoding retrovirus vector particles. *Gene Ther* 14, 595-603.

Rezvani, K., Brenchley, J. M., Price, D. A., Kilical, Y., Gostick, E., Sewell, A. K., Li, J., Mielke, S., Douek, D. C., and Barrett, A. J. (2005). T-cell responses directed against multiple HLA-A*0201-restricted epitopes derived from Wilms' tumor 1 protein in patients with leukemia and healthy donors: identification, quantification, and characterization. *Clin Cancer Res* 11, 8799-8807.

Rezvani, K., Grube, M., Brenchley, J. M., Sconocchia, G., Fujiwara, H., Price, D. A., Gostick, E., Yamada, K., Melenhorst, J., Childs, R., *et al.* (2003). Functional leukemia-associated antigen-specific memory CD8+ T cells exist in healthy individuals and in patients with chronic myelogenous leukemia before and after stem cell transplantation. *Blood* 102, 2892-2900.

Rezvani, K., Yong, A. S., Tawab, A., Jafarpour, B., Eniafe, R., Mielke, S., Savani, B. N., Keyvanfar, K., Li, Y., Kurlander, R., and Barrett, A. J. (2009). Ex vivo characterization of polyclonal memory CD8+ T-cell responses to PRAME-specific peptides in patients with acute lymphoblastic leukemia and acute and chronic myeloid leukemia. *Blood* 113, 2245-2255.

Richter, J., Neparidze, N., Zhang, L., Nair, S., Monesmith, T., Sundaram, R., Miesowicz, F., Dhodapkar, K. M., and Dhodapkar, M. V. (2013). Clinical regressions and broad immune activation following combination therapy targeting human NKT cells in myeloma. *Blood* 121, 423-430.

Robbins, P. F., Li, Y. F., El-Gamil, M., Zhao, Y., Wargo, J. A., Zheng, Z., Xu, H., Morgan, R. A., Feldman, S. A., Johnson, L. A., *et al.* (2008). Single and dual amino acid substitutions in TCR CDRs can enhance antigen-specific T cell functions. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 180, 6116-6131.

Robbins, P. F., Morgan, R. A., Feldman, S. A., Yang, J. C., Sherry, R. M., Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Nahvi, A. V., Helman, L. J., Mackall, C. L., *et al.* (2011). Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29, 917-924.

Robins, H. S., Campregher, P. V., Srivastava, S. K., Wachter, A., Turtle, C. J., Kahsai, O., Riddell, S. R., Warren, E. H., and Carlson, C. S. (2009). Comprehensive assessment of T-cell receptor beta-chain diversity in alphabeta T

cells. *Blood* 114, 4099-4107.

Sadovnikova, E., Jopling, L. A., Soo, K. S., and Stauss, H. J. (1998). Generation of human tumor-reactive cytotoxic T cells against peptides presented by non-self HLA class I molecules. *European journal of immunology* 28, 193-200.

Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *The Journal of experimental medicine* 179, 1109-1118.

Savage, P., Gao, L., Vento, K., Cowburn, P., Man, S., Steven, N., Ogg, G., McMichael, A., Epenetos, A., Goulmy, E., and Stauss, H. J. (2004). Use of B cell-bound HLA-A2 class I monomers to generate high-avidity, allo-restricted CTLs against the leukemia-associated protein Wilms tumor antigen. *Blood* 103, 4613-4615.

Schmidt, C. S., and Mescher, M. F. (1999). Adjuvant effect of IL-12: conversion of peptide antigen administration from tolerizing to immunizing for CD8+ T cells in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 163, 2561-2567.

Schmitt, T. M., Ragnarsson, G. B., and Greenberg, P. D. (2009). T cell receptor gene therapy for cancer. *Human gene therapy* 20, 1240-1248.

Schroers, R., Shen, L., Rollins, L., Xiao, Z., Sonderstrup, G., Slawin, K., Huang, X. F., and Chen, S. Y. (2003). Identification of MHC class II-restricted T-cell epitopes in prostate-specific membrane antigen. *Clin Cancer Res* 9, 3260-3271.

Schumacher, T. N. (2002). T-cell-receptor gene therapy. *Nature reviews Immunology* 2, 512-519.

Serafini, M., Manganini, M., Borleri, G., Bonamino, M., Imberti, L., Biondi, A., Golay, J., Rambaldi, A., and Introna, M. (2004). Characterization of CD20-transduced T lymphocytes as an alternative suicide gene therapy approach for the treatment of graft-versus-host disease. *Human gene therapy* 15, 63-76.

Sercarz, E. E., Lehmann, P. V., Ametani, A., Benichou, G., Miller, A., and Moudgil, K. (1993). Dominance and crypticity of T cell antigenic determinants. *Annual review of immunology* 11, 729-766.

Shuman, S. (1991). Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America 88, 10104-10108.

Siegel, R., Naishadham, D., and Jemal, A. (2013). Cancer statistics, 2013. *CA: a cancer journal for clinicians* 63, 11-30.

Small, E. J., Fratesi, P., Reese, D. M., Strang, G., Laus, R., Peshwa, M. V., and Valone, F. H. (2000). Immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer with antigen-loaded dendritic cells. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 18, 3894-3903.

Small, E. J., Sacks, N., Nemunaitis, J., Urba, W. J., Dula, E., Centeno, A. S., Nelson, W. G., Ando, D., Howard, C., Borellini, F., *et al.* (2007). Granulocyte macrophage colony-stimulating factor--secreting allogeneic cellular immunotherapy for hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res* 13, 3883-3891.

Small, E. J., Schellhammer, P. F., Higano, C. S., Redfern, C. H., Nemunaitis, J. J., Valone, F. H., Verjee, S. S., Jones, L. A., and Hershberg, R. M. (2006). Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24, 3089-3094.

Smith, C., and Cerundolo, V. (2001). Immunotherapy of melanoma. *Immunology* 104, 1-7.

Snijders, A., Kalinski, P., Hilkens, C. M., and Kapsenberg, M. L. (1998). High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. *International immunology* 10, 1593-1598.

Sommermeier, D., Conrad, H., Kronig, H., Gelfort, H., Bernhard, H., and Uckert, W. (2013). NY-ESO-1 antigen-reactive T cell receptors exhibit diverse therapeutic capability. *Int J Cancer* 132, 1360-1367.

Spranger, S., Javorovic, M., Burdek, M., Wilde, S., Mosetter, B., Tippmer, S., Bigalke, I., Geiger, C., Schendel, D. J., and Frankenberger, B. (2010). Generation of Th1-polarizing dendritic cells using the TLR7/8 agonist CL075. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 185, 738-747.

Spranger, S., Jeremias, I., Wilde, S., Leisegang, M., Starck, L., Mosetter, B., Uckert, W., Heemskerk, M. H., Schendel, D. J., and Frankenberger, B. (2012). TCR-transgenic lymphocytes specific for HMMR/Rhamm limit tumor outgrowth in vivo. *Blood* 119, 3440-3449.

Starr, T. K., Jameson, S. C., and Hogquist, K. A. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annual review of immunology* 21, 139-176.

Steinman, R. M., and Banchereau, J. (2007). Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 449, 419-426.

Sternberg, C. N. (2008). Systemic chemotherapy and new experimental approaches in the treatment of metastatic prostate cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO 19 Suppl* 7, vii91-95.

Straetemans, T., Coccoris, M., Berrevoets, C., Treffers-Westerlaken, E., Scholten, C. E., Schipper, D., Ten Hagen, T. L., and Debets, R. (2012). T-cell receptor gene therapy in human melanoma-bearing immune-deficient mice: human but not mouse T cells recapitulate outcome of clinical studies. *Human gene therapy* 23, 187-201.

Taraban, V. Y., Rowley, T. F., O'Brien, L., Chan, H. T., Haswell, L. E., Green, M. H., Tutt, A. L., Glennie, M. J., and Al-Shamkhani, A. (2002). Expression and costimulatory effects of the TNF receptor superfamily members CD134 (OX40) and CD137 (4-1BB), and their role in the generation of anti-tumor immune responses. *European journal of immunology* 32, 3617-3627.

Timmerman, J. M., Czerwinski, D. K., Davis, T. A., Hsu, F. J., Benike, C., Hao, Z. M., Taidi, B., Rajapaksa, R., Caspar, C. B., Okada, C. Y., *et al.* (2002). Idiotypic-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. *Blood* 99, 1517-1526.

Topalian, S. L., Hodi, F. S., Brahmer, J. R., Gettinger, S. N., Smith, D. C., McDermott, D. F., Powderly, J. D., Carvajal, R. D., Sosman, J. A., Atkins, M. B., *et al.* (2012). Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *The New England journal of medicine* 366, 2443-2454.

Trautmann, L., Labarriere, N., Jotereau, F., Karanikas, V., Gervois, N., Connerotte, T., Coulie, P., and Bonneville, M. (2002). Dominant TCR V alpha usage by virus and tumor-reactive T cells with wide affinity ranges for their specific antigens. *European journal of immunology* 32, 3181-3190.

Tung, M. C., Tsai, C. S., Tung, J. N., Tsao, T. Y., Chen, H. C., Yeh, K. T., Liao, C. F., and Jiang, M. C. (2009). Higher prevalence of secretory CSE1L/CAS in sera of patients with metastatic cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 18, 1570-1577.

Ullman, K. S., Powers, M. A., and Forbes, D. J. (1997). Nuclear export receptors:

from importin to exportin. *Cell* 90, 967-970.

van Loenen, M. M., de Boer, R., Amir, A. L., Hagedoorn, R. S., Volbeda, G. L., Willemze, R., van Rood, J. J., Falkenburg, J. H., and Heemskerk, M. H. (2010). Mixed T cell receptor dimers harbor potentially harmful neoreactivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 10972-10977.

van Loenen, M. M., de Boer, R., Hagedoorn, R. S., Jankipersadsing, V., Amir, A. L., Falkenburg, J. H., and Heemskerk, M. H. (2013). Multi-cistronic vector encoding optimized safety switch for adoptive therapy with T-cell receptor-modified T cells. *Gene Ther* 20, 861-867.

Van Tendeloo, V. F., Van de Velde, A., Van Driessche, A., Cools, N., Anguille, S., Ladell, K., Gostick, E., Vermeulen, K., Pieters, K., Nijs, G., *et al.* (2010). Induction of complete and molecular remissions in acute myeloid leukemia by Wilms' tumor 1 antigen-targeted dendritic cell vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 13824-13829.

Wadelin, F., Fulton, J., McEwan, P. A., Spriggs, K. A., Emsley, J., and Heery, D. M. (2010). Leucine-rich repeat protein PRAME: expression, potential functions and clinical implications for leukaemia. *Molecular cancer* 9, 226.

Weber, J. S., Vogelzang, N. J., Ernstoff, M. S., Goodman, O. B., Cranmer, L. D., Marshall, J. L., Miles, S., Rosario, D., Diamond, D. C., Qiu, Z., *et al.* (2011). A phase 1 study of a vaccine targeting preferentially expressed antigen in melanoma and prostate-specific membrane antigen in patients with advanced solid tumors. *J Immunother* 34, 556-567.

Weinschenk, T., Gouttefangeas, C., Schirle, M., Obermayr, F., Walter, S., Schoor, O., Kurek, R., Loeser, W., Bichler, K. H., Wernet, D., *et al.* (2002). Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer research* 62, 5818-5827.

Weintraub, K. (2013). Drug development: Releasing the brakes. *Nature* 504, S6-8.

Wellmann, A., Krenacs, L., Fest, T., Scherf, U., Pastan, I., Raffeld, M., and Brinkmann, U. (1997). Localization of the cell proliferation and apoptosis-associated CAS protein in lymphoid neoplasms. *The American journal of pathology* 150, 25-30.

Wieczorek, A., and Uharek, L. (2013). Genetically Modified T Cells for the Treatment of Malignant Disease. *Transfusion medicine and hemotherapy* :

offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie 40, 388-402.

Wilde, S., Sommermeyer, D., Frankenberger, B., Schiemann, M., Milosevic, S., Spranger, S., Pohla, H., Uckert, W., Busch, D. H., and Schendel, D. J. (2009). Dendritic cells pulsed with RNA encoding allogeneic MHC and antigen induce T cells with superior antitumor activity and higher TCR functional avidity. *Blood* 114, 2131-2139.

Wolchok, J. D., Kluger, H., Callahan, M. K., Postow, M. A., Rizvi, N. A., Lesokhin, A. M., Segal, N. H., Ariyan, C. E., Gordon, R. A., Reed, K., *et al.* (2013). Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *The New England journal of medicine* 369, 122-133.

Wolfel, C., Drexler, I., Van Pel, A., Thres, T., Leister, N., Herr, W., Sutter, G., Huber, C., and Wolfel, T. (2000). Transporter (TAP)- and proteasome-independent presentation of a melanoma-associated tyrosinase epitope. *Int J Cancer* 88, 432-438.

Wucherpennig, K. W., Allen, P. M., Celada, F., Cohen, I. R., De Boer, R., Garcia, K. C., Goldstein, B., Greenspan, R., Hafler, D., Hodgkin, P., *et al.* (2007). Polyspecificity of T cell and B cell receptor recognition. *Semin Immunol* 19, 216-224.

Yewdell, J. W., and Del Val, M. (2004). Immunodominance in TCD8+ responses to viruses: cell biology, cellular immunology, and mathematical models. *Immunity* 21, 149-153.

Zhu, Y. Y., Machleder, E. M., Chenchik, A., Li, R., and Siebert, P. D. (2001). Reverse transcriptase template switching: a SMART approach for full-length cDNA library construction. *Biotechniques* 30, 892-897.

VIII ANHANG

Tabelle II-17 Peptide der HLA-A2 Selbstpeptid-Bibliothek (Metabion)

ID	Peptidsequenz	Protein	Genbezeichnung
1	GVYDGEEHSV	MAGE-B2	melanoma antigen family B, 2
2	MVDGTLILL	HLA-E	major histocompatibility complex, class I, E
3	LLIENVASL	GSHX	glutathione peroxidase 1
4	ILDQKINEV	ODC1	ornithine decarboxylase 1
5	ALSNLEVKL	URP2	fermitin family homolog 3
6	FLGENISNFL	APOL	apolipoprotein L, 1
7	FLDPRPLTV	CYP1B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1
8	ILDKKVEKV	HSPCB	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1
9	ILMEHIHKL	RPL19	ribosomal protein L19
10	LLDVPTAAV	IFI30	interferon, gamma-inducible protein 30
11	SLLPAIVEL	PP2R1A	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A
12	VMDSKIVQV	KPNA6	karyopherin alpha 1 (importin alpha 5)
13	ALSDHHIYL	ALDOA	aldolase A, fructose-bisphosphate
14	GLATDVQTV	PSMB3	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 3
15	TLWVDPYEV	BTG1	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative
16	ALFGALFLA	PLTP	phospholipid transfer protein
17	SLAGGIIGV	HNRPK	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
18	LLLEDLIRC	TNRC11	thyroid hormone receptor-associated protein
19	NTCPYVHNI	POLR3K	polymerase(RNA) III (DNA directed)polypeptideK
20	QVCAIHERV	EIF3S8	eukaryotic translation initiation factor 3, SU C
21	STADVIQHC	NUP188	nucleoporin 188kDa
22	KLFDDKLQNC	OSBPL9	oxysterol binding protein-like 9

23	ILHDDEVTV	RPLP1	ribosomal protein, large, P1
24	QLVDIIEKV	PSME3	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 3 (PA28 gamma; Ki)
25	SLLGGDVVS	DSIPI	TSC22 domain family, member 3
26	FLLDKKIGV	CCT2	chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta)
27	FLDPIKAYL	GPR116	G protein-coupled receptor 116
28	DVASVIVTKL	SRP54	signal recognition particle 54kDa
29	ILDTGTIQL	CML1	putative N-acetyltransferase CML1
30	KLLEPVLLL	RPS16	ribosomal protein S16
31	LLFDRPMHV	HNRPM	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M
32	QLIDKVWQL	SEC14L1	SEC14-like 1 (<i>S. cerevisiae</i>)
33	RLLDYVVNI	FLJ20004	KN motif and ankyrin repeat domains 2
34	VLATLVLLL	EST-Sequenz	
35	SLLPPDALVGL	SEC23B	Sec23 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)
36	YLDNGVVFFV	DDB1	damage-specific DNA binding protein 1, 127kDa
37	YLIPLLERL	DDX6	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 6
38	ELTLGEFLKL	BIR5	baculoviral IAP repeat-containing 5
39	GLVPFLVSV	KONA*0201	karyopherin alpha 2 (RAG cohort 1, importin alpha 1)
40	SVFAGVVG	GUCY1A3	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3
41	ALLGKIEKV	GALT2	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2
42	YIVPCLHEV	EGLN3	egl nine homolog 3 (<i>C. elegans</i>)
43	TLYEAVREV	RPL10A	ribosomal protein L10a
44	FANERCLQL	CCD99	coiled-coil domain containing 99
45	SLLDIIEKV	TSC2	tuberous sclerosis 2
46	LLAAWTARA	APP	amyloid beta (A4) precursor protein
47	IITKEVLAP	EST-Sequenz	
48	QLQEGKNVIGL	TAGLN2	transgelin 2
49	LLGPRLVLA	TMP21	transmembrane emp24-like trafficking protein 10 (yeast)
50	ALFDIESKV	FOLH1	folate hydrolase (prostate-specific membrane

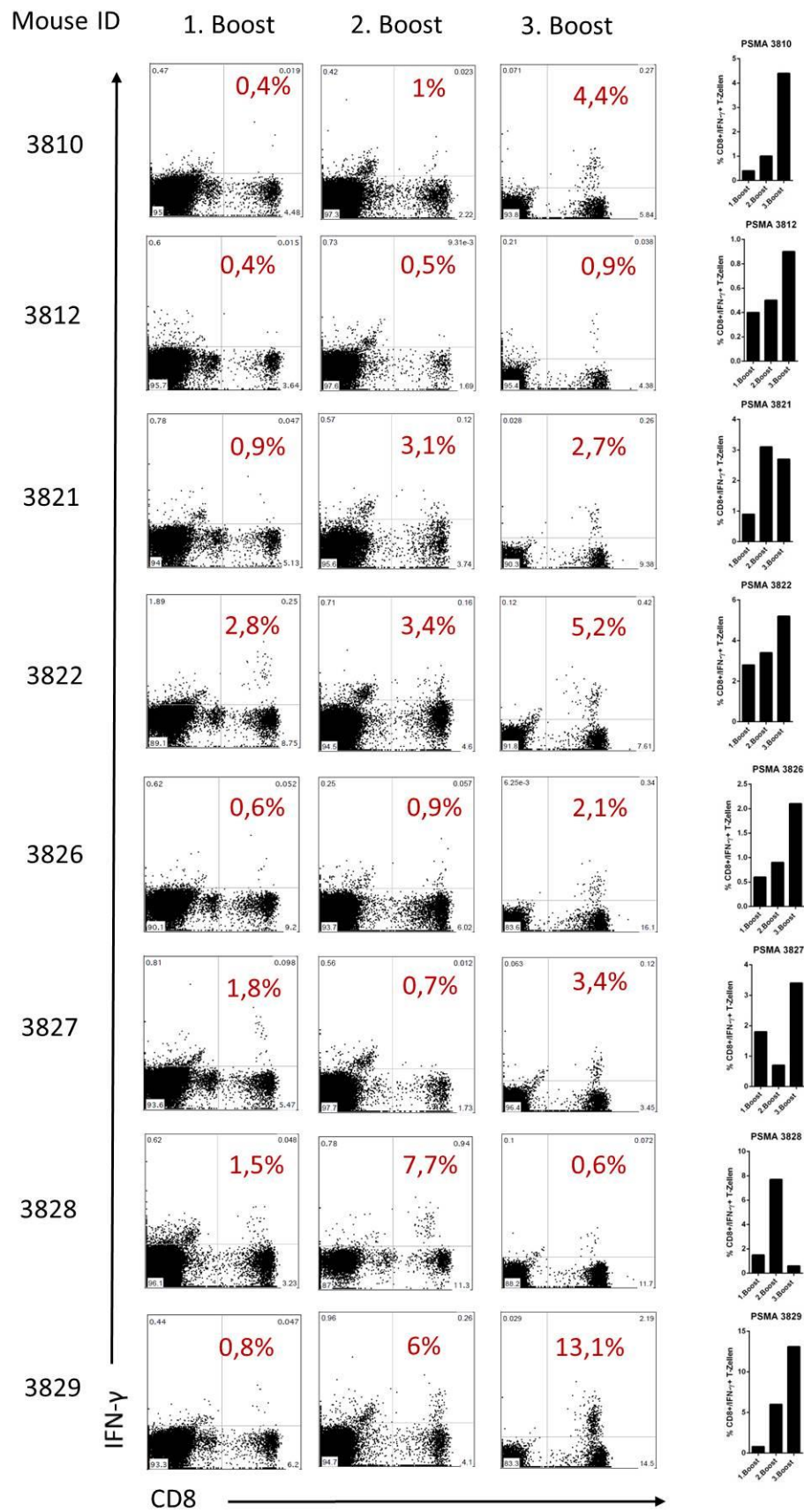
			antigen) 1
51	IVIEAIHTV	Thymidylate Kinase	thymidylate kinase-vaccinia virus
52	HTANIQTLI	CASC5	cancer susceptibility candidate 5
53	RLASYLDRV	KRT 18	keratin 18
54	ALFDGDPHL	KIAA0367	prune homolog 2
55	SLSEKTVLL	CD59	CD59 molecule, complement regulatory protein
56	SLLDKIIGA	PTRF	polymerase I and transcript release factor
57	LMISRTPEV	IGHG3	immunoglobulin heavy locus
58	HLPETKFSEL	AIM1	absent in melanoma 1
59	KLHGVNINV	RBM4	RNA binding motif protein 4
60	TVGLIRNL	CTNB1	catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa
61	GLNEEIARV	KNTC2	NDC80 homolog, kinetochore complex component
62	TIIDLPGITRV	MX2	myxovirus (influenza virus) resistance 2
63	LAALPHSCL	RGS5	regulator of G-protein signaling 5
64	YVDPVITSI	MET_HUMAN	met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)
65	SVASTITGV	ADFP	adipose differentiation-related protein
66	ALLNIKVKL	KRT 18	Keratin 18
67	MLERVIKNY	MAGE-A4	melanoma antigen family A, 4
68	RLAADDFRV	KRT 18	keratin 18
69	ALVDHVAEL	MYO1G	myosin IG
70	FLHDISDVQL	LASS1	LAG1 homolog, ceramide synthase 1
71	DVYSGTPTKV	SLBP	stem-loop binding protein
72	KMISAIPTL	MUC16	mucin 16, cell surface associated
73	YLLPAIVHI	P68_HUMAN	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5
74	HVIDYILD	ID4	inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein
75	ALKDLINEA	PCNA	proliferating cell nuclear antigen
76	ALSDLEITL	FERMT2	fermitin family homolog 2

77	EIFDKIHSL	GLE1	GLE1 RNA export mediator homolog
78	ETYKRISRV	AURKA	aurora kinase A
79	FIIQGLRSV	HLA-DQA1	major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1
80	FLFELPSRL	C11orf2	chromosome 11 open reading frame2
81	GLNDFIQKI	SGK1	serum/glucocorticoid regulated kinase 1
82	HVGDIIEV	MPP2	membrane protein, palmitoylated 2 (MAGUK p55 subfamily member 2)
83	IARLPSSTL	KIF18B	kinesin family member 18B
84	IMLEALERV	SNRPG	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide G
85	KLDAFVEGV	ATP6V1C1	ATPase,H+-transporting,lysosomal 42kDa,V1 subunit C1
86	KLGEIVTTI	ARF1	ADP-ribosylation factor 1
87	LVRDVVSSL	PPAN	peter pan homolog; suppressor of SWI4 1 homolog
88	NLAEDIMRL	VIM	Vimentin
89	NLMEQPIKV	JUP	junction plakoglobin
90	RLAQHITYV	MCM7	minichromosome maintenance complex component 7
91	RLFSSIVTV	DUS2L	dihydrouridine synthase 2-like, SMM1 homolog
92	RLQEEINEV	IKIP	I kappa B kinase interacting protein isoform2
93	RLWNETVEL	DEPDC1B	DEP domain containing 1B; breast cancer cell 3
94	SIAGIFKEV	SLC35C2	solute carrier family 35, member C2 ; ovarian cancer overexpressed
95	SLDTQPKKV	TCF3	transcription factor 3 (E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47)
96	SLFPGKLEV	FLII	flightless I homolog
97	TLADLVHHV	TRRAP	transformation/transcription domain-associated protein
98	TLTSKLYSL	UCRC	cytochrome b-c1 complex subunit 9 isoform a
99	TLWGIQKEL	LDHA	lactate dehydrogenase A
100	TTVEIFNKL	VPS35	vacuolar protein sorting 35 homolog
101	VLADALKSI	RPS15A	ribosomal protein S15a

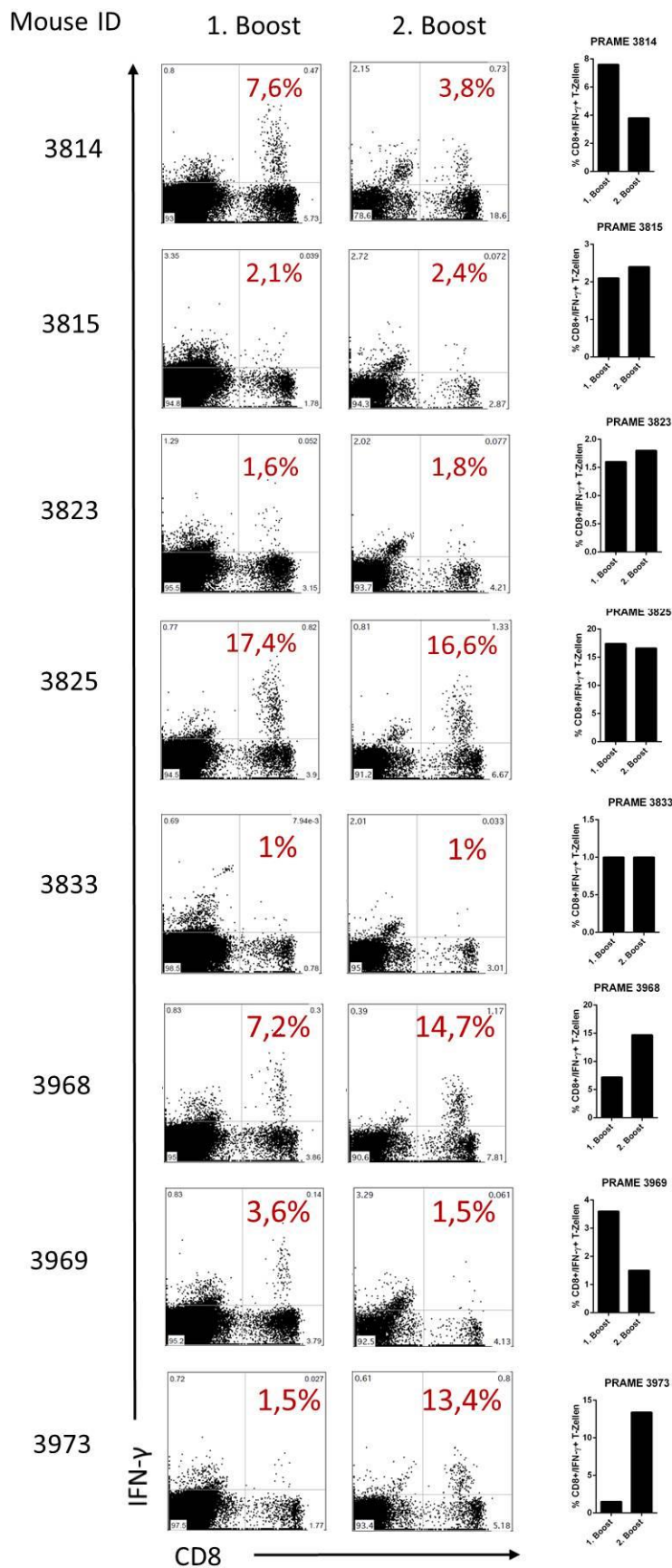
102	VVHTPETS	SLC16A3	solute carrier family 16, member 3 (monocarboxylic acid transporter 4)
103	YAYDGKDYI	HLA-A	major histocompatibility complex, class I, A
104	YLADTVQKL	SOHLH2	spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 2
113	EISDIHTKL	TBK1	TANK-binding kinase 1
114	ETSPVLQKL	RNASEN	ribonuclease type III, nuclear
115	FVNDIFERI	HIST1H2BD	histone cluster 1, H2bd
116	HLANIVERV	TRIM22	tripartite motif-containing 22
117	KLYGKPIRV	SF3B4	splicing factor 3b, subunit 4, 49kDa
118	NLYPFVKTV	ATIC	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase
119	RVAGIHKKV	RPL13	ribosomal protein L13
120	TLPEDFIRV	-	Estimated sequence

Tabelle II-20 Personen

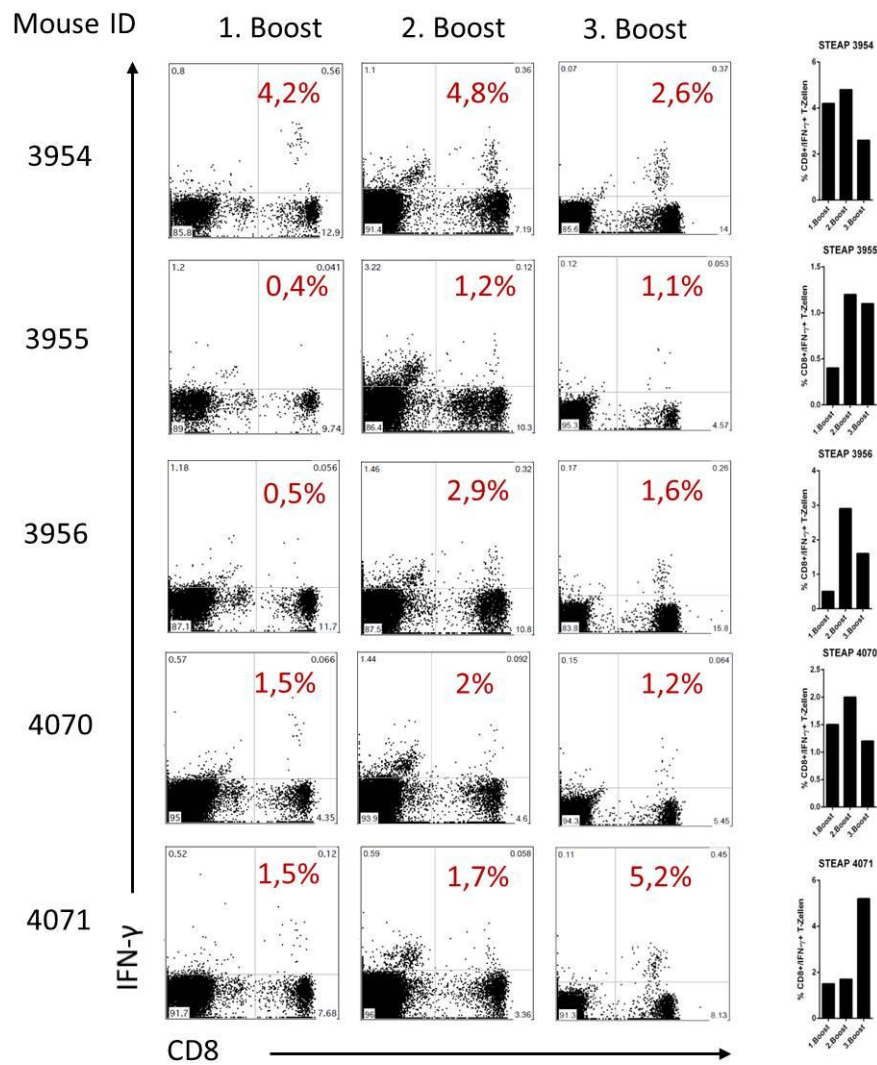
Name	Institut
Blankenstein, T.	Institut für Molekulare Medizin, Max-Dellbrück-Zentrum Berlin
Busch, D.	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, TU München
Ellinger, C.	Institut für Molekulare Immunologie, Helmholtz-Zentrum München
Gavvovidis, I.	Institut für Molekulare Medizin, Max-Dellbrück-Zentrum Berlin
Milošević, S.	Institut für Molekulare Immunologie, Helmholtz-Zentrum München
Pohla, H.	Labor für Tumormmunologie, LMU München
Uckert, W.	Institut für Molekulare Medizin, Max-Dellbrück Zentrum Berlin
Wehner, C.	Institut für Molekulare Immunologie, Helmholtz-Zentrum München

A PSMA-Mäuse

B PRAME-Mäuse



C STEAP-Mäuse



D PSCA-Maus

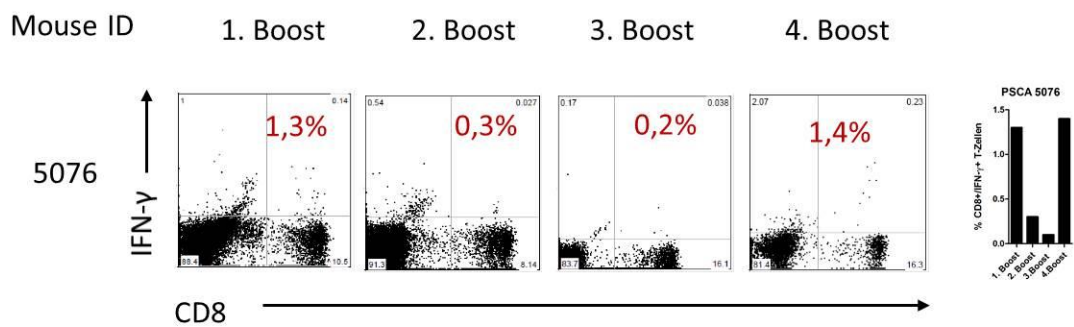


Abbildung III-7.1: Analyse peptidspezifischer T-Zellen in ABabDII-Mäusen

Gezeigt sind die nach *in-vitro*-Peptid-Stimulation und Antikörperfärbung durchgeführten FACS-Analysen. Rot angegeben ist jeweils der ermittelte Prozentsatz IFN- γ -positiver Zellen, anteilig an den CD8-positiven T-Zellen. Dargestellt sind die Analysen nach jedem Boost (außer dem letzten Boost vor Tötung der Tiere) für die Antigene PSMA (**A**), PRAME (**B**), STEAP (**C**) und PSCA (**D**). Gezeigt sind jeweils nur die Tiere (ID-Nummern angegeben), bei denen eine T-Zell-Induktion erfolgreich war und deren Milzen letztendlich auch zur Anreicherung spezifischer T-Zellen verwendet werden konnten.

Alle Immunisierungen, Boosts und die anschließenden Screenings wurden von Dr. Ioannis Gavvovidis in Berlin durchgeführt.

DANKSAGUNG

Ich möchte mich ganz herzlich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Zeit meiner Doktorarbeit begleitet und unterstützt haben.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Göbel, der sich bereiterklärt hat, diese externe Doktorarbeit zu betreuen und meine Arbeit vor der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians Universität München zu vertreten.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dolores Schendel, für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in ihrer Gruppe zu machen. Ich danke ihr, dass sie mir die unglaublichen wissenschaftlichen Ressourcen ihrer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt hat, und es mir so als Tierärztin ohne immunologische Vorkenntnisse und mit keinerlei Laborerfahrung ermöglicht hat, einen ganz neuen Weg zu beschreiten.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Bernhard Frankenberger, der mir mit seiner fachlichen Kompetenz und vielen intensiven Diskussionen der bestmögliche Betreuer und ein stets geduldiger Begleiter war. Ich danke ihm für sein Vertrauen und seinen Beistand, auch in den schwierigen Zeiten. Vielen Dank.

Auch bedanke ich mich bei Prof. Thomas Blankenstein, in dessen Arbeitsgruppe ich hospitieren durfte und der mir seine wertvollen ABabDII-Mäuse für meine Arbeit zur Verfügung gestellt hat. Vielen Dank auch an Dr. Ioannis Gavvovidis, der mich während meines Aufenthaltes in Berlin betreut hat und auch später immer geduldig meine Fragen beantwortet hat. Vielen Dank auch dafür, dass er die Immunisierungen und Screens bei meinen Mäusen in Berlin durchgeführt hat.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Mitgliedern der AG Schendel, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Ein besonderer Dank geht an Dr. Carina Wehner und Dr. Christian Ellinger, die mir viel gezeigt haben und die bei allen molekularbiologischen Fragen meine erste Anlaufstelle waren. Ich bedanke mich ganz herzlich bei Dr. Slavoljub Milošević für die Bereitstellung der Vektoren seiner TCR-Bibliothek und bei Dr. Joachim Ellwart und Dr. Josef Mysliwietz für

ihre unermüdliche Hilfe bei meinen ersten Sortier-Versuchen. Des Weiteren bedanke ich mich bei Barbara Mosetter für ihre Hilfe bei den Zytotoxizitätstests und ihre stetige Unterstützung. Ich danke ganz herzlich Sabine Eichenlaub für all ihre Hilfe, vor allem in der Anfangszeit. Außerdem Adam Slusarski und Dr. Silke Raffeggerst, die mir gute Labor-Kollegen waren und mir immer wieder unter die Arme gegriffen haben.

Vielen Dank an alle weiteren Kollegen der AG Schendel und des IMI, von denen einige über die Zeit nicht nur Kollegen, sondern auch Freunde wurden.

Mein Dank gilt meinen Freunden und meiner ganzen Familie, ganz besonders meinen Eltern, die immer an mich geglaubt und mich ermutigt haben. Meiner Mutter, der stärksten Fau die ich kenne. Meinem Vater, in Liebe.

Aus tiefstem Herzen danke ich Alexander, für Alles.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Die Arbeit wird hiermit erstmalig einer Prüfungskommission vorgelegt. Diese Dissertation wurde von Frau Prof. Dr. Dolores J. Schendel am Institut für Molekulare Immunologie, Helmholtz Zentrum München, betreut und wird von Herr Prof. Göbel vor der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians Universität München vertreten.

München, den 1.10.2014

(Manon Weis)